

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Aspects de la variabilité intraspécifique chez le rotififère *Brachionus calyciflorus pallas* en Meuse

Cornil, Eric

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**ASPECTS DE LA VARIABILITÉ INTRASPÉCIFIQUE CHEZ LE
ROTIFÈRE *Brachionus calyciflorus* PALLAS EN MEUSE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Eric CORNIL

Août 2003

Aspects de la variabilité intraspécifique chez le rotifère
***Brachionus calyciflorus* PALLAS en Meuse**

Mémoire présenté pour l'obtention
du Diplôme de Licencié en Biologie

Eric Cornil

2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de biologie.

Rue de Bruxelles 61 -5000 Namur

Tel. 081/72.41.11 - Télécopie 081/23.03.91

E-mail : <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Aspects de la variabilité intraspécifique chez le rotifère *Brachionus calyciflorus* PALLAS en Meuse

Eric CORNIL

Résumé

La variabilité intraspécifique chez un rotifère abondant en Meuse, *Brachionus calyciflorus*, a été étudiée de trois manières.

Des prélèvements accumulés entre 1993 et 1996 ont été d'abord analysés dans une étude biométrique pour évaluer la variation morphologique chez *B. calyciflorus* et la lier aux variations environnementales. Le même travail a été produit chez une autre espèce abondante, *Keratella cochlearis*, à titre de comparaison. L'importance des facteurs extrinsèques dans la variation morphologique est très différente d'une espèce à l'autre. La dépendance est beaucoup plus forte chez *K. cochlearis* que chez *B. calyciflorus*.

Des cultures de *B. calyciflorus* ont été réalisées à partir de rotifères prélevés en Meuse, et d'autres éclos d'œufs dormants prélevés dans le sédiment. La croissance en allopatrie d'un ensemble de 68 clones révèle une très grande variété de comportements en culture.

Enfin, quelques clones ont crû suffisamment pour permettre l'analyse en électrophorèse de la variabilité allélique à trois *loci*.

Les observations suggèrent que les populations prélevées en Meuse sont constituées de différents clones en mélange, bien que la multiplicité des facteurs qui déterminent la composition clonale est grande et n'a pu être qu'approchée.

Promoteur : Prof. J.-P. DESCY

Tuteur : L. VIROUX

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de biologie.

Rue de Bruxelles 61 -5000 Namur

Tel. 081/72.41.11 - Téléfax 081/23.03.91

E-mail : <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Aspects of intraspecific variability in *Brachionus calyciflorus* PALLAS from the river Meuse

Eric CORNIL

Abstract

Intraspecific variability was examined in the rotifer *Brachionus calyciflorus* from the River Meuse, using three methods.

Samples obtained between 1993 and 1998 were analysed in a biometric study of morphological variation in *B. calyciflorus*, in order to establish links with environmental factors. The same was performed on another rotifer, *Keratella cochlearis*, as a comparison. The importance of extrinsic factors in morphological variation is distinct according to the species. Dependancy is higher in *K. cochlearis* than it is in *B. calyciflorus*.

Orthoclinal cultures of *B. calyciflorus* were initiated from individuals taken in the field, and from resting eggs from the sediment of the river. The growth of 68 clones in allopatry revealed a large variety of behaviours.

Finally, some clones grew enough to be analysed electrophoretically and investigate allelic variation at three *loci*.

Observations suggest that the populations in the Meuse are a mixture of clones, although the variety of factors affecting clonal diversity has only been superficially approached.

Advisor : Prof. J.-P. DESCY

Tutor : L. VIROUX

Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Synthèse bibliographique.....	3
2.1. Les rotifères, généralités.....	3
2.1.1. Organisation anatomique.....	3
2.1.2. Le cycle reproductif et ses particularités.....	5
2.2. La variation morphologique chez les rotifères.....	7
2.2.1. Importance des facteurs extrinsèques.....	7
2.2.1.1. Incidence de la disponibilité en nourriture.....	7
2.2.1.2. La température.....	7
2.2.1.3. Effets des prédateurs.....	8
2.2.1.4. La cyclomorphose.....	9
2.2.2. La variabilité intrinsèque.....	9
2.2.2.1. Historique des premières études.....	9
2.2.2.2. Les deux modèles relatifs à la constitution génotypique des populations de rotifères.....	10
2.2.2.3. Utilisation des allozymes comme marqueurs de la variabilité	10
2.2.2.4. Autres marqueurs, autres techniques.....	11
2.3. Biologie de l'espèce cible : <i>Brachionus calyciflorus</i>.....	11
2.4. Objectifs et stratégie.....	14
3. Matériel et méthodes.....	15
3.1. Le milieu étudié: La Meuse.....	15
3.2. Stratégie pour l'analyse biométrique des populations de <i>Brachionus calyciflorus</i> et <i>Keratella cochlearis</i> prélevées en Meuse entre 1993 et 1998.....	15
3.3. Elevage orthoclonal de <i>Brachionus calyciflorus</i> en conditions contrôlées	17
3.3.1. Cultures initiées à partir de populations prélevées <i>in situ</i>	17
3.3.1.1. Choix et localisation des stations.....	17
3.3.1.2. Récolte.....	18
3.3.1.3. Isolement et élevage.....	19
3.3.1.4. La préparation des algues.....	20
3.3.2. Cultures initiées à partir d'œufs de durée extraits du sédiment.....	20

3.4. Examen du polymorphisme enzymatique par électrophorèse.....	21
3.4.1. La récolte des rotifères élevés dans l'incubateur.....	21
3.4.2. L'électrophorèse.....	22
3.4.2.1. Le chargement des gels et la mise en route.....	23
3.4.2.2. La révélation des enzymes.....	24
 4. Résultats et discussion.....	 25
4.1. l'analyse biométrique des populations de <i>Brachionus calyciflorus</i> et <i>Keratella cochlearis</i> prélevées en Meuse entre 1993 et 1998.....	25
4.1.1. <i>Brachionus calyciflorus</i>	25
4.1.1.1. Variations interannuelles.....	25
4.1.1.2. Liens avec les facteurs environnementaux.....	26
4.1.2. <i>Keratella cochlearis</i>	28
4.1.2.1. Variations interannuelles.....	28
4.1.2.2. Liens avec les facteurs abiotiques.....	29
 4.2. Elevage de <i>Brachionus calyciflorus</i> en allopatrie.....	 32
4.2.1. Succès des éclosions d'oeufs de durée.....	32
4.2.2. Croissance parallèle de 68 clones en allopatrie.....	34
4.2.3. Croissance de la totalité des clones.....	35
4.2.4. Illustrations photographiques de la variabilité.....	36
4.2.5. Remarques méthodologiques sur l'élevage clonal de <i>Brachionus</i>	38
4.2.5.1. La culture des algues.....	38
4.2.5.2. La récolte.....	38
4.2.5.3. L'élevage en lui-même.....	38
 4.3. Premières données issues de l'analyse des allozymes chez <i>Brachionus calyciflorus</i>	 40
 5. Discussion générale, conclusions et perspectives.....	 42
 6. Références bibliographiques	

1. Introduction

Après avoir étudié le zooplancton de la Meuse, VIROUX (2000) a posé une question importante pour comprendre le fonctionnement des systèmes fluviaux : D'où provient le plancton dans un milieu où il ne peut plus migrer vers l'amont ?

Il posa alors l'hypothèse que si du plancton survit quelque part en amont et sert de réserve pourensemencer le fleuve, il pourrait y avoir une spécificité génétique à chaque population source, ceci parce qu'elles sont isolées géographiquement et ne sont pas mélangées. Le problème est de trouver un ou plusieurs marqueurs fiables de cette identité propre.

Les rotifères sont les organismes les plus abondants dans le zooplancton des fleuves. Ils se reproduisent par parthénogenèse et donc une population en laboratoire peut démarrer d'un individu pour produire plusieurs copies du même génome.

La première étape dans la résolution de cette énigme est de voir si un échantillon prélevé en Meuse est constitué de millions de copies du même individu souche bien adapté au milieu, ou si au contraire plusieurs souches différemment adaptées cohabitent ensemble.

La morphologie est le premier outil d'étude de la diversité chez les écologistes. Les rotifères *Brachionus calyciflorus* et *Keratella cochlearis*, deux représentants majeurs du zooplancton de la Meuse, sont connus pour montrer un degré élevé de variabilité de taille et d'ornementation de leur carapace. La variation morphologique de *Brachionus calyciflorus* est connue comme étant fortement influencée par l'identité clonale, donc par le génome (NOGRADY, 1993) à l'opposé de celle de *Keratella cochlearis* qui est beaucoup plus dépendante des facteurs environnementaux (HILLBRICHT-ILKOWSKA, 1983). Est-ce le cas en Meuse ? Ce sera notre première question.

Ensuite, on peut exploiter la grande prolificité des rotifères pour réaliser des élevages en laboratoire. Placés en conditions identiques de culture, différentes souches croissent-elles exactement de la même manière ou au contraire quelle est la variabilité « comportementale » entre elles ? Ces observations peuvent fournir des indications sur la situation naturelle.

Finalement, comme la morphologie et la démographie ne sont pas des critères absolus permettant de dire que différentes souches sont distinctes génétiquement, il est nécessaire de s'intéresser au génome proprement dit. L'électrophorèse de protéines (allozymes) est encore actuellement la méthode la plus rapide, peu onéreuse et facilement interprétable, pour typer les clones et pouvoir dire si oui ou non plusieurs clones sont différents génétiquement. Nous emploierons cette technique chez *B. calyciflorus* en utilisant comme matériau de base nos cultures.

Dans la première partie de ce travail, une brève synthèse des connaissances sur les rotifères est effectuée. Les concepts liés à la variabilité morphologique et génétique chez

ces organismes sont développés. L'espèce principale utilisée, *Brachionus calyciflorus* est présentée.

Dans une seconde section, les stratégies et les outils utilisés pour mesurer la morphologie des deux espèces, pour la récolte, l'isolement et le clonage des souches de *Brachionus calyciflorus* à partir des populations naturelles et des œufs dormants contenus dans les sédiments, et la réalisation des électrophorèses d'allozymes, sont détaillés.

Une troisième section présente les résultats qui sont discutés dans leur ensemble avant de tirer nos conclusions et de suggérer des études futures.

2. Synthèse bibliographique

Il est propice de dresser une vue générale sur la biologie et l'écologie des Rotifères. Il est intéressant aussi de développer notre perception d'une des espèces dominantes en Meuse, celle qui va principalement nous occuper ici, c'est-à-dire, *Brachionus calyciflorus*.

2.1 Généralités sur les rotifères (NOGRADY 1993)

Les Rotifères ont été découverts par LEEUWENHOEK en 1703 et comptent environs 2000 espèces. Ils sont proches dans la classification du vivant d'autres organismes vermiformes tels que les Plathelminthes, Nématodes et autres.

On les trouve dans les lacs, les étangs, l'eau saumâtre, dans les flaques, dans le sol humide, dans la mousse humide, dans les gouttières des maisons, etc. On les rencontre donc en fait partout où il y a un peu d'eau.

Leur taille varie de 100 à 800 µm, approchant rarement le mm.

Le phylum des Rotifères se divise en trois classes :

- Les *Bdelloidea* sont eux essentiellement benthiques
- Les *Seisonoidea* se trouvent en milieu marin.
- Les *Monogononta* comprennent toutes les espèces planctoniques

Ces derniers vont donc nous intéresser.

2.1.1 Organisation anatomique

La figure 1 représente un rotifère de type *Brachionus*. Trois régions s'y distinguent.

La tête

Les rotifères portent une *corona* (constituée de deux couronnes ciliaires) qui assure deux fonctions, à savoir la locomotion ainsi que la capture de la nourriture. Le battement en rythme des cils donne l'impression d'une roue qui tourne, d'où le nom de ces organismes.

Le tronc

Le corps des rotifères peut être recouvert d'une *lorica* ("tunique" de nature scléroprotéique, monobloc ou fragmentée, sécrétée par l'hypoderme). Sa forme et ses diverses ornementsations (épines, striations, verrues) sont les critères de base de la taxonomie des rotifères.

La cavité pharyngienne qui suit l'ouverture buccale est pourvue de puissants muscles. Elle abrite le *mastax*, diverticule muni de pièces masticatrices dures, mobiles et articulées entre elles. Il constitue un critère d'identification en microscopie électronique à balayage.

La résorption des aliments est stomacale. Le tube digestif se termine par un cloaque qui collecte les déchets liquides du métabolisme et les produits sexuels.

Le système excrétoire se réduit à un simple appareil protonéphridien connecté au cloaque par une vessie.

Les rotifères ne présentent pas de systèmes respiratoire ou circulatoire.

Le cerveau résulte de la fusion de deux ganglions cérébroïdes. Les rotifères possèdent à un œil simple, unicellulaire, dont la position est généralement dorsale. Des organes tactiles, cils et soies sensoriels, dont la localisation sur le corps est variable, complètent ce système.

Le pied.

Celui-ci est présent chez les espèces qui conservent la capacité de s'attacher au substrat; il disparaît chez les espèces strictement planctoniques. Musculeux et rétractile, il est muni d'orteils à la base desquels s'abouchent des glandes pédieuses à sécrétion adhésive.

Chaque organe du rotifère est formé d'un nombre fixe de cellules et aucune division cellulaire supplémentaire ne peut se produire après l'éclosion. Cette organisation cellulaire est dite '*eutélique*'. Cette propriété en fait un matériau de choix pour les recherches sur le vieillissement cellulaire (FANESTIL & BARROWS, 1965; KING & MIRACLE, 1980).

2.1.2 Le cycle reproductif et ses particularités

La reproduction des rotifères se fait la plupart du temps clonalement, par la succession de plusieurs (nombreuses) générations parthénogénétiques

La figure 2 représente le cycle de vie général de ces organismes.

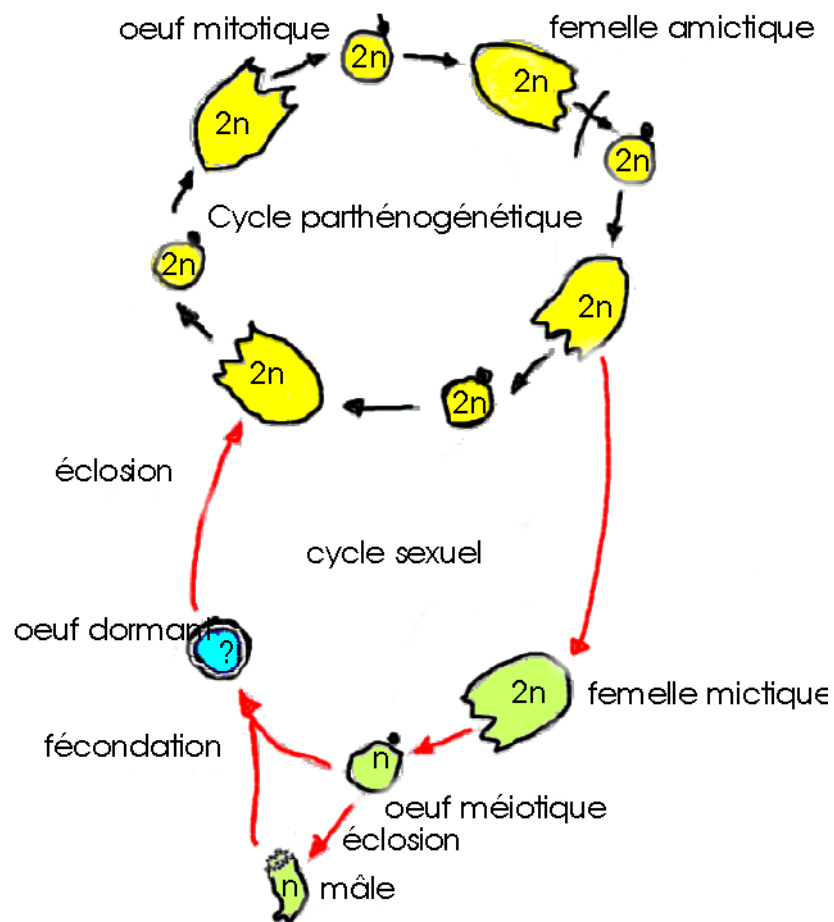


Figure 2 : Cycle reproducteur général des rotifères (adapté d'après NOGRADY, 1993)

Les femelles diploïdes dites '*amictiques*' des *Monogononta* possèdent un ovaire unique qui génère des œufs mitotiques diploïdes de manière plus ou moins continue. Ceux-ci sont parfois portés par la mère mais le plus souvent ils sont libérés dans le milieu. Ils éclosent rapidement et donnent de nouvelles femelles '*amictiques*' identiques génétiquement à leur mère. Les populations sont constituées la plupart du temps de ces femelles. Plusieurs générations successives peuvent se côtoyer.

La reproduction sexuée (le cycle sexuel) rompt épisodiquement le cycle de vie habituel basé sur la parthénogenèse (GILBERT, 1974; POURRIOT & SNELL, 1983).

Des femelles, qualifiées de '*mictiques*', pondent des œufs méiotiques haploïdes, une partie de ceux-ci éclosent pour donner naissance à des mâles. L'apparition de ces stades particuliers est observée lorsque les conditions du milieu se dégradent comme lors de la raréfaction des ressources nutritives, la surpopulation (KING & SNELL, 1980, SERRA & CARMONA, 1993) ou l'approche de l'hiver (POURRIOT, 1965). On les rencontre aussi lors de périodes de croissance importante, quand les conditions sont favorables à une production abondante d'œufs de tous types (HERZIG, 1983 ; GILBERT, 1995).

L'âge des femelles et leurs génotypes influent sur leur apparition. Les clones manifestent des propensions très variables à la reproduction sexuée (POURRIOT & SNELL, 1983). Des populations maintenues pendant de longues périodes en conditions contrôlées peuvent aller jusqu'à perdre cette faculté.

Une fois l'œuf pondu, l'identité reproductive de la femelle qui en découlera ('*mictique*' ou '*amictique*') est irréversiblement fixée

Les mâles sont beaucoup plus petits que les femelles et ont une existence éphémère orientée vers la fécondation des œufs haploïdes. Ils possèdent un tube digestif atrophié et ne s'alimentent pas. Leurs testicules sont, par contre, volumineux.

Les œufs fécondés évoluent en œufs dormants (ou œufs de durée). Ces œufs possèdent un opercule et un tégument modifié. Leur développement est retardé. Ils tombent dans les sédiments, ou flottent librement car l'espace entre les deux coques peut se remplir d'air. Ils peuvent aussi restés accrochés à de nombreux substrats (y compris aux pattes des oiseaux migrateurs) par des mécanismes d'adhésion.

Les facteurs qui influencent l'éclosion des œufs dormants sont nombreux. Ils varient d'une espèce à l'autre.

Une température optimale est souvent requise, elle est alors liée à l'espèce. (GILBERT, 1974 ; POURRIOT & SNELL, 1983). Il semble que les changements de la température provoquent l'émergence en masse des espèces sténothermes plus ou moins pérennes comme *Keratella cohlearis*. Celles-ci éclosent à des températures comprises entre 5 et 15°C. Les espèces printanières tardives et d'été comme *Asplanchna priodonta* éclosent entre 10 et 15°C.

L'exposition à la lumière est bénéfique bien que souvent non nécessaire pour *Brachionus calyciflorus* (POURRIOT & SNELL, 1983) tandis qu'elle est obligatoire pour *Brachionus plicatilis*.

La variation de la photopériode peut jouer un rôle important. L'absence de lumière retarde l'éclosion des œufs dormants de *Brachionus rubens*.

Une salinité optimale est souvent observée et cela surtout chez les espèces se développant en milieu marin (POURRIOT & SNELL, 1983 et références *intra*)

La présence de certaines algues (MINKOFF *et al.*, 1983) peut influencer l'éclosion. Des signaux chimiques peuvent aussi la stimuler en absence de lumière. Une réaction particulière peut générer des prostaglandines qui induisent l'éclosion (SNELL, 1998).

2.2. La variation morphologique chez les rotifères

La variation morphologique reflète l'ensemble des changements phénotypiques de l'apparence d'une espèce. Ce phénomène est fréquent chez de nombreux rotifères (NOGRADY, 1993), et est explicable par de nombreux facteurs qui peuvent être environnementaux (extrinsèques) ou génotypiques (intrinsèques)

2.2.1. Importance des facteurs extrinsèques

2.2.1.1. Incidence de la disponibilité en nourriture

Selon HILLBRICHT-ILKOWSKA (1983), la taille de l'épine postérieure de *Keratella cochlearis* et la présence des individus sans épines est principalement contrôlée par la disponibilité en nourriture.

Lorsque la concentration en nourriture augmente légèrement, la taille de la lorica et des œufs de *Brachionus calyciflorus* augmentent jusqu'à un maximum. Ensuite, si la concentration augmente encore, le rotifère voit se réduire sa taille et apparaître un nombre d'œufs plus important (GALINDO *et al.*, 1993).

Pour *Brachionus calyciflorus* et *Keratella cochlearis*, lorsque la concentration en particules alimentaires se réduit, un corps large est un avantage car les plus gros "individus" mangent plus, et plus vite (BROOKS & DODSON, 1965 ; PEJLER, 1980)

2.2.1.2. La température

Au-dessus d'un seuil nutritif, la température est le facteur essentiel qui contrôle la longueur du corps. Pour nos deux espèces précédentes, les grands individus avec de courtes épines se distinguent à température basse (POURRIOT, 1973 ; LINDSTRÖM & PEJLER, 1975 ; LINDSTRÖM, 1983 ; GALKOVSKAYA, 1983, DIEGUEZ *et al.*, 1998). Les facteurs intrinsèques caractérisant un clone sont révélés par l'existence de tailles variées à une même température

2.2.1.3. Effets des prédateurs

Les rotifères sont des mauvais nageurs, et sont donc fortement vulnérables à la prédation. Bien que leur petite taille réduit leur visibilité aux poissons, elle les rend aussi plus sensible aux prédateurs invertébrés, lesquels trouvent leur proie par contact. Les prédateurs des rotifères sont nombreux : ce sont des protozoaires, d'autres rotifères tels *Asplanchna*, des crustacés cladocères, copépodes, et certains macro-invertébrés tels les diptères (WILLIAMSON, 1983).

Les rotifères sont la plupart du temps négligés par les alevins de poissons qui préfèrent les crustacés, plus volumineux que les rotifères, bien qu'ils en consomment un large nombre.

Si les rotifères produisent une lorica dure, la réponse à la prédation est typiquement la production d'épines ou d'autres projections destinées à empêcher l'ingestion ou à les rendre moins vulnérables à la prédation tactile. (GILBERT, 1967, 1980). Ainsi, lorsqu'il est perturbé, *Brachionus calyciflorus* ferme sa corona et augmente la pression hydrostatique dans son *pseudocoelum*. Cette élévation de pression cause le raidissement et l'écartement des épines postérieures, à la manière d'un avion à géométrie variable. L'augmentation de la taille est suffisante pour prévenir l'ingestion par *Asplanchna*, celui-ci rejette sa proie. Bien qu'il tentera encore de l'avaler, la minute de sursis, permet à la proie de s'écarter sans dommage (GILBERT, 1967).

L'exposition à des facteurs solubles sécrétés dans l'eau par des prédateurs comme *Asplanchna* ou les copépodes est le stimulus déclencheur qui induit la formation de nouvelles épines, ou l'allongement d'épines déjà présentes chez plusieurs espèces planctoniques comme c'est le cas chez *Brachionus quadridentatus* (GILBERT, 2001).

Divers degrés de spécificité dans l'induction de la réponse existent (STEMBERGER & GILBERT, 1985). Par exemple, *Keratella cochlearis* et *Brachionus calyciflorus* réagissent aux copépodes et à *Asplanchna*, alors que *Keratella slacki* ne répond qu'à *Asplanchna* et ne développe aucune défense morphologique en présence de copépodes.

Une réponse identique suggère que certains produits métaboliques en jeux sont communs aux copépodes et aux rotifères. La libération d'une lipoprotéine par *Asplanchna* dans un milieu de culture contenant des *Brachionus calyciflorus* produit des jeunes armés d'épines postéro-latérales. (DE BEAUCHAMP, 1952 ; GILBERT, 1967).

Cet avantage sélectif permet de se maintenir en présence de prédateurs et de survivre à d'autres espèces plus compétitives pour les ressources alimentaires, mais non protégées.

2.2.1.4. La cyclomorphose

La cyclomorphose est un mécanisme fondamentalement intrinsèque, puisque toute l'information nécessaire à sa réalisation est présente dans le génome, mais on peut la classer parmi les mécanismes extrinsèques puisque ses déclencheurs sont le plus souvent extérieurs. Les changements à caractères saisonniers du phénotype et plus particulièrement des caractères facilement reconnaissables comme la taille du corps ou la longueur de certaines ornementsations telles les épines sont désignés sous le terme de cyclomorphose. Ces changements sont observables au sein d'un même clone. Ce phénomène est fréquent parmi les rotifères et surtout chez *Keratella* et *Brachionus* (HILLBRICHT-ILKOWSKA, 1983; NOGRADY, 1993 et références *intra*).

Examinons à présent les déterminants purement intrinsèques de la variabilité morphologique chez les rotifères.

2.2.2. La variabilité intrinsèque

La variabilité intraspécifique chez les rotifères n'est bien sûr pas limitée à la morphologie. Lorsque cette dernière ne permet pas de discriminer suffisamment, il faut s'intéresser à la variabilité contenue dans le génome. Chez *Brachionus plicatilis*, une espèce cousine de *B. calyciflorus* qui nous intéresse pour ce travail, la génétique a d'abord permis d'apporter des réponses à une énigme morphologique, comme nous allons le retracer brièvement.

2.2.2.1 Historique des études (CIROS-PEREZ *et al.*, 2001)

Le rotifère qui a été et qui est le plus étudié est *Brachionus plicatilis*. Bien qu'on observait à l'origine des formes différentes par leur taille, dites L (large) et S (small), les scientifiques qui n'analysaient que la morphologie pensaient avoir affaire à une seule espèce avec des souches très différentes en taille.

Ensuite, l'utilisation des allozymes bouleversa ce point de vue en révélant des patrons de migrations différents pour les formes L et S. L'analyse d'une cinquantaine de clones différents permit de distinguer deux espèces. La première, représentée par les grandes formes (L), conserva le nom de *Brachionus plicatilis* (*sensus stricto*) et la seconde, regroupant les clones de petite taille, fut plus tard nommée *Brachionus rotundiformis*.

Par après, toujours par l'utilisation des allozymes, une discrimination plus poussée au sein du groupe "S" divisa celui-ci en deux nouvelles espèces *Brachionus rotundiformis* et *Brachionus ibericus* (GOMEZ *et al.*, 1995). A l'heure actuelle, on suspecte non plus un total de trois mais bien neuf espèces (L. VIROUX, communication personnelle). La discrimination entre ces différentes espèces a été validée par une analyse morphologique fine (CIROS-PEREZ *et al.*, 2001), et par la réalisation de croisements entre souches d'espèces supposées distinctes (GÓMEZ & SERRA, 1996). Pour désigner cet ensemble d'espèces qui ne diffèrent que peu par la morphologie, mais ne se reproduisant pas entre elles, on parle d'espèces "sœurs" (sibling species).

L'emploi de l'électrophorèse de protéines pour la résolution de problèmes de taxonomie est courant (MURPHY *et al.*, 1990 in NOGRADY, 1993), mais son application aux rotifères est restée limitée.

2.2.2.2. Les deux modèles relatifs à la constitution génotypique des populations de rotifères

Deux théories existent pour expliquer la succession temporelle des clones d'une même espèce dans un même milieu. L'électrophorèse a permis de démontrer la pertinence de ces deux modèles dans des situations diverses.

Le modèle de la *discontinuité génétique complète* proposé par KING (1972, 1977) suppose le remplacement intégral d'un clone par un autre, avec l'absence de chevauchement temporel entre ceux-ci. Un clone éclos, un autre meurt ; ils ne se côtoient pas.

Le second modèle, dit de *discontinuité génétique incomplète*, s'est appliqué à certains milieux (KING & ZHAO, 1987). Il suppose, par opposition, le chevauchement temporel et donc la coexistence de différents clones dans un même milieu. C'est à ce modèle qu'obéissent les populations recensées dans de nombreuses études ultérieures (GÓMEZ *et al.*, 1995)

2.2.2.3. Utilisation des allozymes comme marqueurs de la variabilité

La technique des allozymes exploite le polymorphisme contenu dans le génome, et exprimé dans la structure primaire de certaines enzymes. Ces marqueurs protéiques sont largement répandus et utilisés.

Chez tout organisme diploïde, chaque enzyme est codée par deux gènes qui peuvent être identiques (homozygotie) ou différents (hétérozygotie). Différents allèles du même gène codent pour des variantes, typiquement de charge, de la même enzyme. Les allozymes sont séparées principalement par la charge générée par le changement de structure, ce qui rend les différents allèles détectables (RICHARDSON *et al.*, 1986 in GOMEZ, 1998)

Les données obtenues sont objectives et mesurables facilement, sur base de la mobilité des différentes bandes. Les données sont des estimations de la variation génétique. Le matériel est relativement bon marché par rapport à d'autres méthodes car il demande un temps d'entraînement court.

Le principal désavantage lié à l'utilisation des allozymes est le niveau limité de détection de la variabilité pour certains *loci*. En effet, les enzymes sont soumises à une pression de sélection, et toute mutation qui en affecte négativement le fonctionnement est plus ou moins rapidement éliminée. Par ailleurs, seule une fraction limitée des substitutions de bases encourues au niveau du génome (lieu de la mutation) se traduisent par une modification de la structure primaire de la protéine qui en découle. Le génome peut subir de nombreuses mutations sans effet sur la protéine, et donc sans variation détectable (KREITMAN, 1983 in GOMEZ, 1998).

Parmi les organismes zooplanctoniques, les rotifères, offrent plusieurs avantages non négligeables au moment d'entreprendre l'étude des allozymes.

Premièrement, les rotifères monogonontes se reproduisent par parthénogenèse et peuvent être clonés en laboratoire. On peut utiliser une biomasse importante composée d'individus identiques, et conserver les clones en culture pour de futures analyses. La quantité d'enzymes obtenue pour un individu ne dépend plus de la taille de celui-ci (WOLF, 1982 *in* GOMEZ, 1998).

Secondairement, les rotifères ont des courts temps de génération (un à deux jours) à opposer à celui d'autres composants du zooplancton tels que les crustacés Cladocères (minimum une semaine). En conséquence, ils ont des taux de croissance intrinsèques élevés, ce qui minimise le temps pour pouvoir obtenir assez d'individus.

2.2.2.4. Autres marqueurs, autres techniques

La technique des microsatellites exploite la diversité de régions correspondant à de multiples répétitions de séquences courtes de 2 à 10 paires de base. (LOXDALE & LUSHAI, 1998 ; LAMBERT, 2003) Ils sont plus discriminants que les allozymes, car y a plus de formes alléliques possibles (séquences supposées non codantes, immunes à la sélection). Chez les organismes clonaux tels le rotifères *Brachionus plicatilis* (*sensu stricto*), cette méthode a révélé une part de l'hétérogénéité génétique non analysable par les patrons d'allozymes (GÓMEZ & CARVALHO, 2000)

2.3. Biologie de l'espèce cible : *Brachionus calyciflorus*

Ce rotifère planctonique appartient à la classe des *Monogononta*. Le genre *Brachionus* est très bien représenté en Meuse par plusieurs espèces dont la plus importante est *Brachionus calyciflorus* (VIROUX, 2000).

En Meuse, *Brachionus calyciflorus* présente plusieurs phases de développement au cours de l'année, avec toutefois des maxima typiquement estivaux. Les densités maximales atteintes par cette espèce décroissent très graduellement entre 1993 et 1998. En 1996 par contre, il est surtout présent au printemps bien qu'il atteigne des maxima comparables par la suite (VIROUX, 2000).

La lorica, molle, lisse et renflée, porte quatre épines antérieures, deux épines postéro-médianes bordant l'ouverture du pied, et dans certains cas deux épines postéro-latérales. Il possède un mastax de type 'malléé'

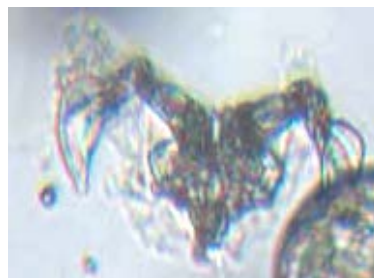


Figure 3: Mastax de *Brachionus calyciflorus* PALLAS obtenu au microscope inversé (photo de l'auteur).

Brachionus calyciflorus est une espèce eurytherme fréquente principalement au printemps (POURRIOT, 1965) Il apparaît surtout dans les milieux eutrophes, dont la Meuse.

Les rotifères végétivores comme *Brachionus calyciflorus* s'alimentent d'algues, de bactéries ou de détritus. Parmi les algues testées par POURRIOT (1965) pour la culture de *Brachionus calyciflorus*, les plus favorables à la croissance sont d'abord les algues vertes Chlorococcales telles *Chlorella*, puis les Euglénophytes (*Trachelomonas volvocina*), les Volvocales (*Chlamydomonas*) et de petites Diatomées (*Cyclotella*).

Brachionus calyciflorus possède la particularité de pouvoir moduler son alimentation en fonction de la taille et de la densité de la nourriture. Il peut former en outre un écran qui éloigne la nourriture de son tube digestif. STARKWEATHER (1995) explique ainsi la sélectivité alimentaire et le fait que certaines algues soient parfois ingérées et parfois pas.

Le taux de croissance maximum en cultures (R_{max}) de *Brachionus calyciflorus* est supérieur à celui de beaucoup d'autres espèces.

Espèces	R_{max}	auteurs
<i>Brachionus calyciflorus</i> :	0.84 j ⁻¹	ROTHHAUPT (1990)
	0.50 j ⁻¹	HALBACH & HALBACH-KEUP (1974)
<i>Brachionus rubens</i>	0.48 j ⁻¹	ROTHHAUPT (1985)
<i>Keratella cochlearis</i>	0,1 j ⁻¹	WALZ (1983)
<i>Lecane</i>	0,2 j ⁻¹	HUMMEN & BEVELHYMER (1980) in WALZ (1983)

Une température de 30°C et une concentration en *Chlorella vulgaris* de 10⁷ cellules par millilitre constituent les meilleures conditions pour l'élevage intensif de *Brachionus calyciflorus* (RICO-MARTINEZ & DODSON, 1991). ROTHHAUPT (1990) a montré que la quantité de nourriture, la taille des particules et la quantité nutritionnelle influencent le taux de croissance. La taille du corps et le taux de croissance maximum sont positivement corrélés (ROTHHAUPT, 1990).

Lorsque la nourriture abonde, les nouveau-nés peuvent rapidement devenir adultes, la durée de vie des femelles diminue. Les femelles amictiques dirigent leur énergie vers la production d'un plus grand nombre de descendants plus petits. Les femelles amictiques sont capables de modifier leur mode de reproduction selon les concentration en nourriture pour maintenir un haut taux de croissance de la population (GUISANDE & MAZUELOS, 1991 ; GALINDO & GUISANDE, 1993).

Le volume des œufs mitotiques est déterminé par les conditions nutritives dans lesquelles a évolué la mère. La température est le facteur le plus important qui influence le taux de développement des œufs à travers son effet sur le métabolisme (HERZIG, 1983 ; YUFERA, 1987). Le temps estimé pour le développement des œufs mitotiques de *Brachionus calyciflorus* à 20°C est de 11 heures (ROTHHAUPT, 1990)

Les femelles mictiques sont génétiquement déterminée pour assurer la continuité de la population . La fécondité et le taux d'apparition de ces femelles à la première génération varient avec des facteurs tels que la température, la qualité de la nourriture, la densité de population, le groupement ou l'âge des descendants. Ces variations sont caractéristiques de l'espèce ou d'un clone (POURRIOT & CLEMENT, 1982). Ces femelles investissent peu d'énergie dans leur oeufs non fertilisés. Ces œufs, pour différentes concentration en nourriture, ont le même volume.

Les mâles de *Brachionus calyciflorus* ont un temps de développement plus court que les femelles et éclosent avec moins de réserves (GALINDO & GUISANDE, 1993).

Les oeufs de durée présentent une phase de latence obligatoire courte de deux semaines environ.

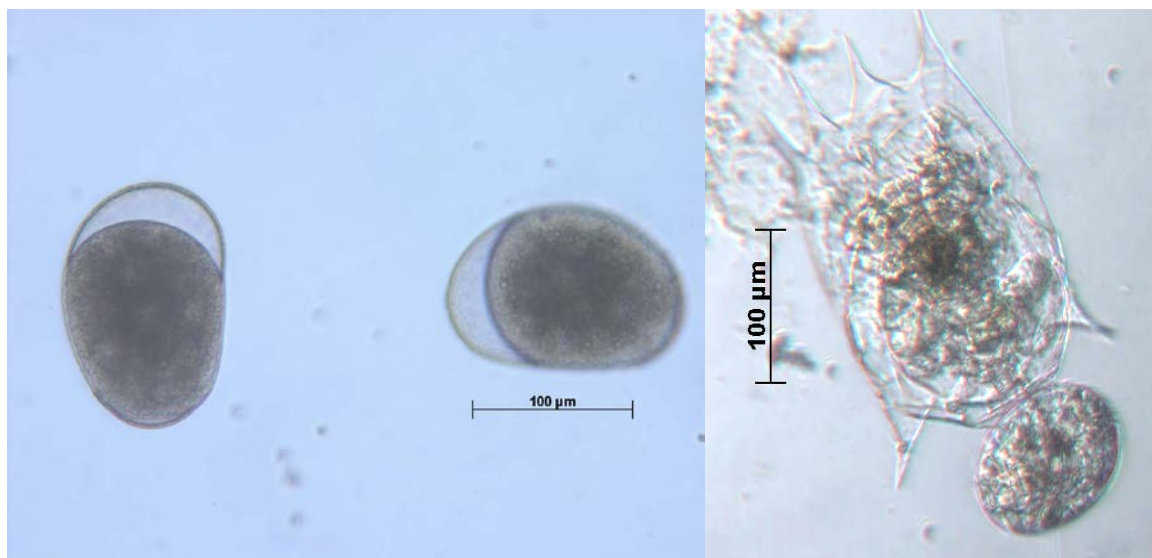


Figure 4 : Oeufs de durée (à droite) , *Brachionus calyciflorus* pourvu d'un œuf mitotique (à gauche). (photos de l'auteur)

La croissance de *Brachionus calyciflorus* est également influencée par la température à laquelle les générations précédentes ont été soumises. Ainsi, GALKOVSKAYA (1983) remarque une mortalité considérable lorsqu'elle acclimate des lignées de clones de 30 à 40°C. Elle remarque que la variabilité entre les clones peut servir pour la sélection de souches à haute performance de croissance, ceci lorsque la reproduction sexuée n'a pas lieu. Un choc froid brutal (6°C pendant deux heures) induit une forte production de femelles mictiques chez *Brachionus rubens* mais n'est par contre pas un stimulus efficace chez *Brachionus calyciflorus* (POURRIOT & ROUGIER, 1999).

2.4 Objectifs et stratégie

Les objectifs de ce mémoire sont :

1. Illustrer la variabilité qui existe parmi les populations de *Brachionus calyciflorus* dans les eaux de la Meuse ;
2. Apporter les premières données sur la variabilité génétique (non observable directement) chez cette espèce, par l'usage des allozymes.

La question à laquelle nous tentons de répondre est : une population prélevée en Meuse est-elle constituée par un seul clone bien adapté, ou au contraire d'un mélange de clones

C'est une question fondamentale qui demande pourtant une réponse compliquée, tellement complexe qu'une simplification est obligatoire. La variabilité sera étudiée de trois façons :

1. Des études passées (VIROUX, 2000) ont montrées clairement que parmi le zooplancton mosan, deux rotifères dominant, *Brachionus calyciflorus* et *Keratella cochlearis*. Bénéficiant de nombreux prélèvements récoltés en Meuse de 1993 à 1998, une étude biométrique sera menée sur ces deux espèces, afin d'obtenir une image plus claire de l'importance des facteurs extrinsèques dans les changements morphologiques. On suppose que cette intervention est différente, d'où le choix de s'intéresser aussi à *Keratella*.
2. Des élevages de *Brachionus calyciflorus* en conditions contrôlées seront réalisés. L'objectif est de comparer la croissance de plusieurs clones séparés, lorsqu'ils sont placés dans les mêmes conditions de culture, pour voir s'ils ont le même comportement.
3. Sur les clones de *Brachionus* les plus « performants », ceux qui croissent le mieux, nous réaliserons une étude des allozymes par électrophorèse, pour révéler la variabilité génétique.

On testera aussi la possibilité d'obtenir des cultures à partir des « banques » d'œufs dormants, comme objectif secondaire.

Comme nous le voyons, nous ne ferons réellement qu'effleurer le sujet mais cette première approche est essentielle pour former une solide base pour de futures études.

3. Matériel et méthodes

3.1. Le milieu étudié

Ce mémoire a comme cadre général la Meuse. Celle-ci prend sa source au niveau du plateau de Langres en France et s'écoule sur environ 900 km jusqu'à un delta commun avec le Rhin situé aux Pays-Bas. A peu près 40 % de son bassin versant (36.011km²) se trouvent en territoire belge. Elle s'écoule à travers la France, les Pays-Bas.

La Meuse en amont de Verdun ne possède pas d'affluents importants. Avant d'atteindre la frontière belge, elle reçoit : la Chiers (rive droite) et la Semois (rive droite). Ensuite, il y a la confluence avec la Lesse (rive droite), la Sambre (rive gauche) et l'Ourthe (rive droite).

Le régime hydrologique de la Meuse est déterminé par le volume des précipitations. L'observation des rotifères dans le système est fonction du débit qui doit idéalement être plus bas que 200 m³s⁻¹. Ces conditions se rencontrent en générale en Meuse de début Avril à Octobre. Ceci a donc déterminé le calendrier de tous les prélèvements d'eau à Tailfer de 1993 à 1998 et aussi en 2003.

Des travaux d'entretien du lit de la haute Meuse sont organisés tous les trois ans. Les barrages sont abaissés, les écluses ouvertes, et le lit partiellement exposé durant trois semaines. Cette période a été mise à profits en 2001 par L.VIROUX pour la récolte de sédiments.

3.2. Stratégie pour l'analyse biométrique des populations de *Brachionus calyciflorus* et *Keratella cochlearis* prélevées en Meuse entre 1993 et 1998

De 1993 à 1998, L.VIROUX a collecté à Tailfer et La Plante une série de 125 échantillons au total. Il a mesuré, entre autres, la densité en *Brachionus calyciflorus* et en *Keratella cochlearis* pour chaque date. Cette année, les piluliers correspondant aux dates auxquelles le développement de ces deux espèces était important ont été ré-analysés. Des mesures ont été effectuées sur 25 individus de chaque espèce dans chaque échantillon sélectionné.



Figure 5 : Microscope inversé Leica DMIL (photo de l'auteur)

Nous avons mesuré quelques caractères simples. Comme critère de taille de la lorica de *Brachionus calyciflorus*, nous avons choisi la distance comprise entre la base de l'échancrure séparant les deux épines médianes antérieures et l'extrémité postérieure de la plaque dorsale (Figure 6). La largeur de la lorica et la taille des épines postéro-latérales ont aussi été enregistrées.

La longueur, la largeur de la lorica de *Keratella cochlearis* ainsi que la taille de son unique épine postérieure ont été mesurées.

Le graticule de l'oculaire est étalonné au moyen d'un millimètre étalon, et ceci pour chaque objectif, pour permettre une conversion rapide des mesures visuelles au graticule en longueurs (en μm). Les objectifs 10X et 20X ont été utilisés le plus couramment.

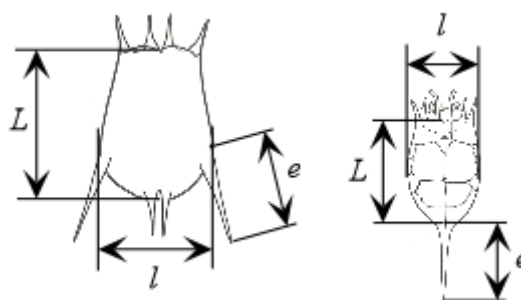


Figure 6 : Identification des paramètres biométriques mesurés chez *Brachionus calyciflorus* (gauche) et *Keratella cochlearis* (droite) ; L = longueur, l = largeur et e = épine.

Des biovolumes approximatifs ont été calculés à partir des formules de RUTTNER-KOLISKO (1977).

- *Brachionus calyciflorus* est considéré comme ellipsoïde et deux formules ont été utilisées :

1. biovolume (μm^3) = $0,52 * (\text{longueur} * \text{largeur} * (0,4 * \text{longueur}))$
2. biovolume (μm^3) = $0,23 * (\text{longueur})^3$

- *Keratella cochlearis* est considéré comme un ½ cône, et une formule est disponible :

$$\text{biovolume } (\mu\text{m}^3) = 0,13 * \text{longueur} * (\text{largeur})^2$$

Longueur et largeur sont exprimées en μm

Au binoculaire, la présence ou l'absence du prédateur *Asplanchna* dans les différents échantillons aux différentes dates a par la suite été vérifiée et notée.

3.3. Elevage orthoclonal de *Brachionus calyciflorus* en conditions contrôlées

3.3.1. Cultures initiées à partir de populations prélevées *in situ*

3.3.1.1. Choix et localisation des stations (figure 7)

WAULSORT se situe à mi-chemin entre le point d'entrée en Belgique et la confluence avec la Lesse. Les prélèvements ont été effectués au niveau du nouveau barrage (figure 8, haut). Cette station témoigne des clonesensemencés le long du cours français du fleuve.

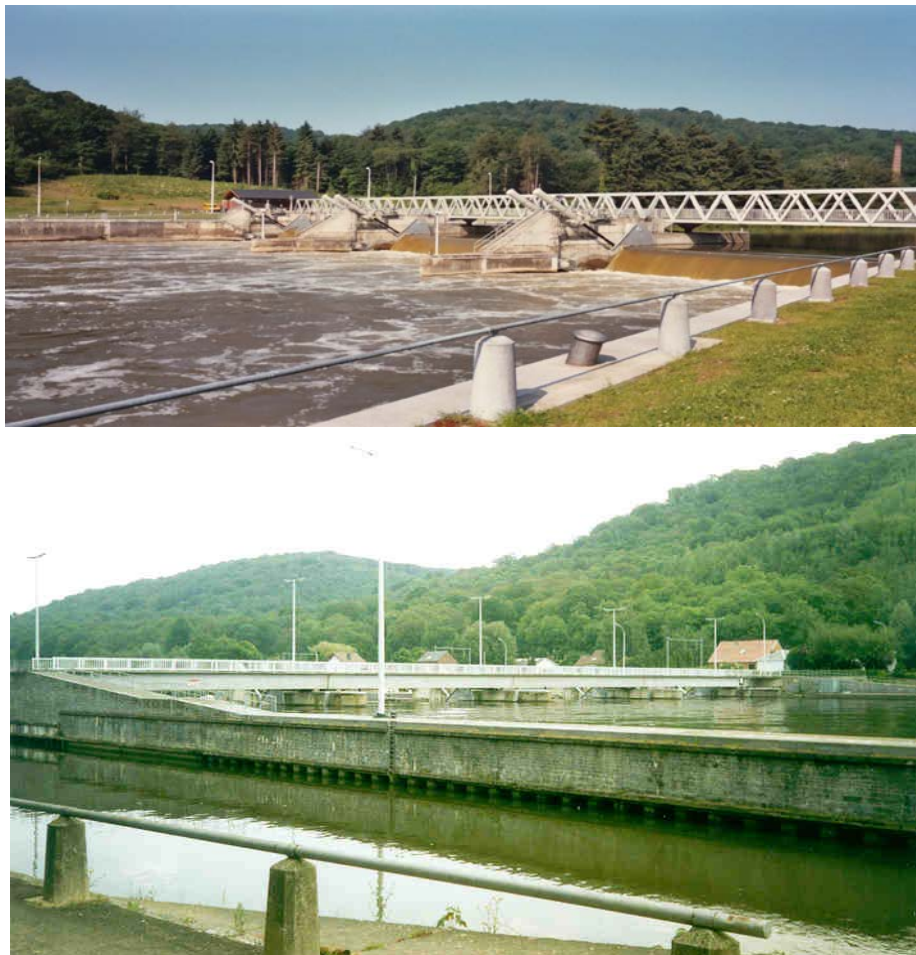


Figure 8 : Passerelle du nouveau barrage à Waulsort (photo de l'auteur), et de l'écluse de Tailfer (photo L. VIROUX).

A TAILFER, les prélèvements ont été effectués au niveau de la passerelle du barrage de l'écluse (Figure 8, bas). Cette station intègre la haute Meuse belge.

La 'passerelle' au dessus de la Sambre à Namur près de l'Arsenal sert de point de comparaison et intègre une partie distincte du bassin versant de la Meuse. sites concernés par cette étude.

3.3.1.2. Récolte

Les prélèvements en Meuse ont été démarrés lorsque sont apparues les conditions de débit ($<200\text{m}^3/\text{s}$) et de température ($>15^\circ\text{C}$) adéquates. Le calendrier est le suivant :

25-mars	Tailfer
25-avril	Tailfer
22, 28 mai	Tailfer, Waulsort, Sambre à Namur (30 mai)
25-juin	

Tous les échantillonnages ont eu lieu entre 9 heures du matin et midi. Nous allions toujours d'abord à Waulsort, le point le plus éloigné des Facultés puis à Tailfer, lorsque les deux stations étaient visitées le même jour.

Les rotifères planctoniques peuvent être facilement collectés avec un seau de 5 L, dont le contenu est vidé sur un filtre de $37\text{ }\mu\text{m}$ de vide de maille adapté dans une colonne de filtration (figure9). Le plancton retenu sur le filtre est alors récolté dans un flacon à col large de 250 mL.



Figure 9 :Récolte des rotifères à Tailfer en juin 2003, photo L.VIROUX (à gauche), la colonne de filtration démontée et montée, le binoculaire utilisé, (en haut à droite), l'élevage des rotifères en boîtes Costar (en bas au milieu) et le thermomètre de l'incubateur marquant 21°C (photos de l'auteur)

Rapidement toutefois, le transport s'est fait plutôt dans 6 gros bidons de 10 L, la filtration étant effectuée secondairement au laboratoire. Moins de 5 heures doivent s'écouler entre la collecte et l'isolation des rotifères, ceci afin d'éviter la sélection génotypique parasite (GÓMEZ, 1998). La proximité des stations et la brièveté de la phase d'échantillonnage (~ 2 heures) étaient compatibles avec ce critère.

3.3.1.3. Isolement et élevage

Les étapes suivantes se sont passées dans un incubateur qui maintient une température stable de 21°C et une photopériode constante de 16 heures de luminosité.

Toutes nos souches sont issues d'une seule femelle amictique. A l'aide du binoculaire, nous avons séparé *Brachionus calyciflorus* des centaines d'autres rotifères collectés et concentrés par la filtration.

Nous placions individuellement les femelles dans les puits d'une plaque de culture cellulaire multi-puits. Un micromanipulateur capillaire, confectionné à partir d'une pipette « pasteur » fondue à la flamme, est utilisé. Après avoir vérifié l'inoculation correcte et sans contamination de chacun de ceux-ci, nous complétons le remplissage par l'apport de Volvic (eau recommandée, JOAQUIM-JUSTO, 1992) et nous ajoutons 250 µL de suspension nutritive (voir ci-dessous).

Nous rajoutions quotidiennement la nourriture en veillant à donner la même quantité à tous les clones. Régulièrement, nous évaluons la croissance de chaque nouvelle 'souche' ainsi établie. Lorsque 20 animaux approximativement étaient présents dans un puit de 2 mL, nous transférons les rotifères dans un contenant plus grand. Une petite boîte de Pétri (15 mL) était indiquée.

Par la suite, plusieurs possibilités ont été testées comme l'usage de grandes boîtes de Pétri (45 mL), d'erlenmeyers ou de boîtes "Costar". Une bourre d'ouate assurait une certaine stérilité de chacun des erlenmeyers. Un système de bullage peut être utilisé avec les boîtes Costar et les erlenmeyers pour maintenir les algues en suspension.

Le renouvellement complet du milieu (Volvic+algues) se faisait 2 à 3 fois par semaine en adaptant le nombre de contenants à la croissance des rotifères. Nous devions pour cela filtrer sur 25 µm l'ensemble des rotifères afin de les récupérer facilement. Nous les prenions un par un lorsque cela était possible.

Le calcul du nombre de rotifères s'est fait visuellement lorsque les boîtes comptaient moins de 100 individus.

Il s'est fait ensuite en prélevant 3 réplicats de 2 mL d'un volume connu et en multipliant le nombre de rotifères dénombré par le facteur correspondant.

3.3.1.4. La préparation des algues

La source de nourriture utilisée est la petite Chlorophycée *Dictyosphaerium ehrenbergianum*. Elle est indiquée pour la culture des rotifères (JOAQUIM-JUSTO, 1992) de par sa petite taille, sa facilité de culture dans un milieu peu riche et peu propice à la contamination. Les cultures sont assurées par L. VIROUX selon le protocole de MAYENNE (1993).

Une partie des algues contenue dans une culture en phase exponentielle de croissance est stérilement vidée dans des tubes à centrifugation, sous une hotte et dans le rayon déterminé par le bec Bunsen, pour limiter les risques de contamination.



Figure 10 : De gauche à droite : culture d'algues, hotte et porte de l'incubateur, tubes et centrifugeuse utilisés (photos de l'auteur).

Les algues sont centrifugées deux fois 20 minutes à 100 G au moyen d'une centrifugeuse Mistral 2000R. Le surnageant est évacué et de l'eau de Volvic est ajoutée au culot avant de recommencer la seconde centrifugation. On sépare ainsi les algues de leur milieu de culture "souillé" qui, trop riche serait plus rapidement contaminé que de l'eau minérale. Les élevages de *Brachionus calyciflorus* poursuivis dans des filtrats de culture sont généralement fort médiocres (POURRIOT, 1965). La nourriture concentrée est ensuite distribuée en même quantité à toutes les boîtes. Chaque clone reçoit ainsi la même quantité d'algues, bien que celle-ci varie un peu de jour en jour. Les conditions de satiété sont toutefois remplies.

3.3.2. Cultures initiées à partir d'œufs de durée extraits du sédiment

En 2001 L.VIROUX a récolté 23 échantillons dans des bouteilles plastiques de 250 mL lors de la période de chômage technique. Huit sites représentatifs de la haute-Meuse ont été choisis. Ce sont par ordre croissant de proximité à la source : Heer-Agimont, Waulsort, Anseremme, une Marina située rive droite en aval de Dinant, Houx, Rouillon, la Grande-île et l'Île de Dave. (figure 7). Ces échantillons gardés humides furent conservés dans un frigo à 4°C. Ils se répartissent comme suit :

	N
Heer-Agimont	3
Waulsort	3
Anseremme	3
Marina	2
Houx	5
Rouillon	2
Grande-île	3
Dave	2

Une série de 23 bouteilles en verre de 100 mL a été inoculée à raison de 50 g de sédiment humide par échantillon. Une fine couche de sédiments est également placée dans une boîte de Pétri correspondante. Bouteilles et boîtes ont ensuite été recouvertes d'eau de ville filtrée sur GF/C. L'ensemble a été laissé incubé à température ambiante. L'observation régulière au binoculaire a permis d'observer l'apparition spontanée de plusieurs espèces.

Nous avons ensuite séparé les oeufs de durée des sédiments. Nous débutons par placer 15 g de sédiment humide dans un tube à centrifuger de 50 mL de contenance. Nous complétons à 40 mL au moyen d'une solution 1.75 M de sucre ultrafin vendu en grande surface, qui remplace avantageusement le sucrose. Une agitation manuelle ainsi qu'au vortex permet d'assurer un bon contact entre la phase sucrée et le sédiment. Les tubes sont centrifugés 5 minutes à 100 G. Ensuite, le surnageant est passé sur un filtre de 25 µm pour retenir les particules contenues dans la phase sucrée. Le filtre est rincé avec un peu d'eau de ville filtrée sur GF/C, dans une grande boîte de Pétri. Cent boîtes ont été ainsi obtenues et régulièrement inspectées pendant 2 à 3 semaines au binoculaire, et la nature des organismes qui ont émergé a été déterminée.

Lorsque *Brachionus calyciflorus* était rencontré, il était mis en culture exactement de la même manière que les clones prélevés *in situ* (voir plus haut).

3.4. Examen du polymorphisme enzymatique par électrophorèse

La méthode utilisée dans ce mémoire est celle détaillée par GÓMEZ (1998) pour étudier le polymorphisme enzymatique chez *Brachionus plicatilis*. L'ensemble de ces manipulations se fait à 4 °C en chambre froide.

3.4.1. La récolte des rotifères élevés dans l'incubateur

Lorsqu'un clone a atteint une densité importante (+/- 2000 animaux), on peut procéder à l'extraction des enzymes. Une trentaine de rotifères est gardée par lignée, pour relancer leur élevage.

Pour concentrer les rotifères, on les filtre à travers un dispositif de confection simple. Le capuchon d'un eppendorf de 1,5 mL de contenance est évidé, et un filtre de nylon de 37 µm de vide de maille est pincé lorsqu'on le referme. Le filtre est coupé à dimension, celle d'une pièce de 10 eurocents.

L'extrémité conique est également amputée pour y adapter un tube de caoutchouc souple. L'ensemble (filtre-eppendorf) est adapté à une seringue de grande capacité, et placé à la verticale dans un cylindre gradué, créant une rampe de filtration..

Les boîtes contenant les rotifères appartenant à la même lignée sont rassemblés dans des erlenmeyers. Leur contenu est filtré en séquence sur la rampe.

Une fois le plus gros du milieu de culture éliminé, la « tête filtrante » (l'eppendorf) est détachée et l'excédant de milieu éliminé en tapotant sur un papier absorbant. Les rotifères sont conditionnés avec 2 mL de tampon Tris-Glycine pH 8,5 sucrés à 10% en volume. L'eppendorf est alors décapsulé délicatement, en opérant au-dessus d'un carré de parafilm. Le filtre est dégagé puis frotté sur le parafilm. Nous tapotions l'eppendorf pour faire tomber les ultimes gouttelettes de tampon. L'hydrophobicité du parafilm assure que les gouttes restent cohérentes. Au moyen de la spatule métallique, non mouillante également, les gouttelettes contenant les rotifères sont récoltées à même le parafilm, et déposées au fond d'un mini-eppendorf de 0,5 mL de contenance correctement libellé au préalable.

Le matériel (rampe de filtration, spatule) est rincé abondamment entre chaque filtration à l'eau de ville. Les filtres et le parafilm sont remplacés intégralement.

3.4.2. L'électrophorèse



Figure 11 : Une partie du matériel utilisé pour les électrophorèses. En bas à gauche, les deux cuves utilisées pour la migration des enzymes sur les gels. Au centre, le récipient permettant d'imprégner les gels dans le tampon de migration (photo L. VIROUX).

L'ensemble des éléments techniques ainsi que les gels utilisés sont originaires de la firme Helena Laboratories (Baumont, Texas, USA) dont la distribution en Belgique est assurée par la firme Goffin-Meyvis.

Les gels d'acétate de cellulose (Titan III Cat. No. #3023, 60x76 mm) doivent être imprégnés au préalable de tampon de migration pendant plus de 20 minutes. Ils sont placés à la verticale dans un portoir déposé au fond d'un récipient de conditionnement (Cat. No. #5093) et le tampon Tris-Glycine pH 8,5 est versé par dessus par un système ne générant pas de bulles.

Tout le système électrophorétique, composé de deux chambres de migration Helena (Cat. No. #4063) doit être complètement imprégné de tampon véhiculaire (Tris-glycine pH 8,5). Pour ce faire, nous procédions à une première électrophorèse 'à blanc', au moyen d'un gel non chargé par cuve (pour faire le lien minimal cathode/anode). Un courant de 2 à 3 mA par gel est nécessaire. L'alimentation est assurée par un bloc débitant 200 V et confectionné par l'atelier d'électronique des Facultés.

3.4.2.1. Le chargement des gels et la mise en route

La mise en suspension des enzymes a eu lieu le plus rapidement possible après la récolte et le conditionnement des rotifères.

Les micro-préparations sont broyées au moyen d'un petit 'potter' constitué d'une lancette de microscopie enrobée dans de la résine époxy moulée dans le fond d'un minieppendorf identique à ceux contenant les rotifères. Une quinzaine de pressions avec le 'potter' sont exercées, en tournant légèrement. La tête du potter est lavée à l'eau milliQ entre chaque broyage, et séchée.

Une fois toutes les aliquotes traitées, elles sont centrifugées 5 minutes à 15000 G pour culotter les débris et libérer le surnageant contenant les enzymes.

Au moyen d'une micropipette, 7 µl de surnageant sont prélevés et placés dans les puits correspondant de la plaque de chargement (Titan III carrying rack, Cat. No. #5110).

Les gels imprégnés de tampon sont extraits un à un du bain délicatement, sans les 'blesser'. Ils sont séchés au moyen de papier buvard (Blotter Pads, Cat. No. #5034), et alignés sur le support d'application, centrés par rapport à l'applicateur.

Les peignes de l'applicateur (Super Z8 applicator kit, Cat. No. #4088) sont plongés dans les puits contenant les suspensions enzymatiques, puis l'ensemble de l'applicateur est transféré sur la base d'alignement et une à plusieurs pressions sont exercées pour appliquer les aliquotes retenues dans les peignes contre le gel. Plusieurs applications successives sont nécessaires lorsque le matériel enzymatique est peu abondant. Une fois chargés, les gels sont étés alignés, gel vers le bas, entre les électrodes d'une des cuves d'électrophorèse, qui ont exactement l'écartement correspondant à leur dimension. Une cuve peut abriter jusqu'à trois gels

La tension(200V) est appliquée une fois tous les gels alignés. Un bon ampérage témoigne de nouveau de la bonne préparation des gels (minimum 1A). La migration est effectuée pendant 30 minutes.

Notons que si les extraits enzymatiques sont conservés rapidement à -80°C, ils peuvent être réutilisés pour plusieurs migrations successives plusieurs jours de suite.

3.4.2.2. La révélation des enzymes

Pour chaque système enzymatique testé, il existe un 'recette' histochimique précise pour révéler la présence de l'enzyme activée sur le gel. La plupart des réactifs et des substrats peuvent être conditionnés dans des flacons compte-gouttes opaques. La révélation repose sur une réaction d'oxydo-réduction médiée par la NAD ou la NADP et donnant lieu à la formation d'un produit coloré là où l'enzyme s'est arrêtée sur le gel

Toutes les mixtures sont préparées dans de petits Bechers de 20 mL, juste avant la révélation, à la semi-obscurité. Les recettes précises pour la révélation des quatre enzymes testées sont comme suit :

MDH , malate déhydrogénase,	EC 1.1.1.37	0,75 mL Tris-HCl pH 8.0 1,5 mL NAD (2 mg/mL) 60 µL MgCl ₂ (20 mg/mL) 240 µL substrat malique (*)
ME , enzyme malique	EC 1.1.1.40	0,75 mL Tris-HCl pH 8.0 1,5 mL NADP (2 mg/mL) 60 µL MgCl ₂ 240 µL substrat malique (*)
(*) substrat malique : 20 mL Tris-HCl pH 9.0 180 mL eau milliQ 3.68 g acide L-malique ajuster à pH 8.0		
LDH , lactate déhydrogénase	EC 1.1.1.27	0,75 mL Tris-HCl pH 7.0 1,5 mL NAD 200 µL acide L-Lactique
PGD , phosphogluconate déhydrogénase	EC 1.1.1.44	0,75 mL Tris-HCl pH 8.0 1,5 mL NADP 100 µL acide 6-phospho- gluconique (20 mg/mL) 100 µL MgCl ₂

La révélation se fait par la technique de l' « agar overlay ». La migration terminée, les gels sont sortis un à un de la cuve et placés côté gel vers le haut dans une grande boîte de Petri. La mixture de révélation est complétée de 100 µL de PMS, Phénazine Métosulfate (2 mg/mL) et de 100 µL de MTT, Methylthiazoletetrazolium (10 mg/mL), et 1,2 mL d'agar bien liquide sont additionnés en dernier lieu à la mixture. Elle est ensuite versée à même le gel dont elle couvre rapidement toute la surface. On place le gel à température ambiante, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment où apparaissent les bandes signalant la présence des enzymes. L'obscurité est requise car les deux produits assurant la formation de la couleur, sont photolabiles. Une fois la révélation terminée, la pellicule d'agar peut être éliminée sous un filet d'eau du robinet, et le gel photographié.

4. Résultats et discussion

4.1. l'analyse biométrique des populations de *Brachionus calyciflorus* et *Keratella cochlearis* prélevées en Meuse entre 1993 et 1998

4.1.1. *Brachionus calyciflorus*

Dans quelle mesure les facteurs extrinsèques expliquent-ils les fluctuations morphologiques de *Brachionus calyciflorus* entre 1993 et 1998 en Meuse ? Les paragraphes suivants essayeront de répondre à cette question.

4.1.1.1. Variations interannuelles

La figure 12 ci-contre synthétise l'ensemble des résultats obtenus à partir des prélèvements de *Brachionus calyciflorus* de 1993 à 1998. La longueur, la largeur, la taille des épines postéro-latérales sont mis en parallèle. Chaque point est, pour rappel, la moyenne des mesures sur 25 rotifères à une date précise.

En 1993, la longueur de *Brachionus calyciflorus* fluctue plus fortement que les autres années. Elle atteint un maximum de 232 μm début septembre. Nous observons une variation de 95 μm . Nous constatons le même phénomène pour la largeur qui varie de plus de 85 μm sur la figure 12.

Nous avons pu, grâce à une ANOVA1 et l'application des contrastes de SCHEFFÉ constater que 1994 se distingue significativement des autres années par sa longueur moyenne réduite, d'approximativement 20 μm . Nous voyons la même réduction pour la largeur. La plupart des données de 1994 sont toutefois très rapprochées dans le temps.

Des densités plus basses en *Brachionus calyciflorus* en 1995 (VIROUX, 2000) résultent en l'absence de données interprétables.

En 1996, nous percevons de début avril à la fin mai une hausse d'une soixantaine de μm de la longueur. C'est la seule année pour laquelle nous disposons de données pour la fin octobre. Nous trouvons une longueur à cette époque de 163 μm .

En 1997, nous observons la présence d'*Asplanchna* en même temps que le second maximum de longueur de *Brachionus calyciflorus* à 181 μm .

Les données pour 1998 débutent fin mai avec la présence d'*Asplanchna* et une taille de *Brachionus* importante, elles se poursuivent avec la disparition du prédateur et par la diminution de taille de sa proie. Ensuite, nous constatons une augmentation de la longueur et de la taille des épines de *Brachionus* à la mi-août en relation avec la réapparition d'*Asplanchna*. La présence du prédateur produit des séquences chez sa proie qui change son phénotype. Ceci concorde avec POURRIOT (1965), KERFOOT (1980) et GILBERT (1983). Nous n'observons pas de différences inter-annuelles significatives entre la taille des épines postéro-latérales de *Brachionus calyciflorus*.

La détermination de l'absence ou de la présence du prédateur *Asplanchna* pour chacun des prélèvements montre que celui provoque bien la croissance des défenses. Parmi les rotifères à très grandes épines, 80 % environ ont été trouvés en même temps qu'*Asplanchna*.

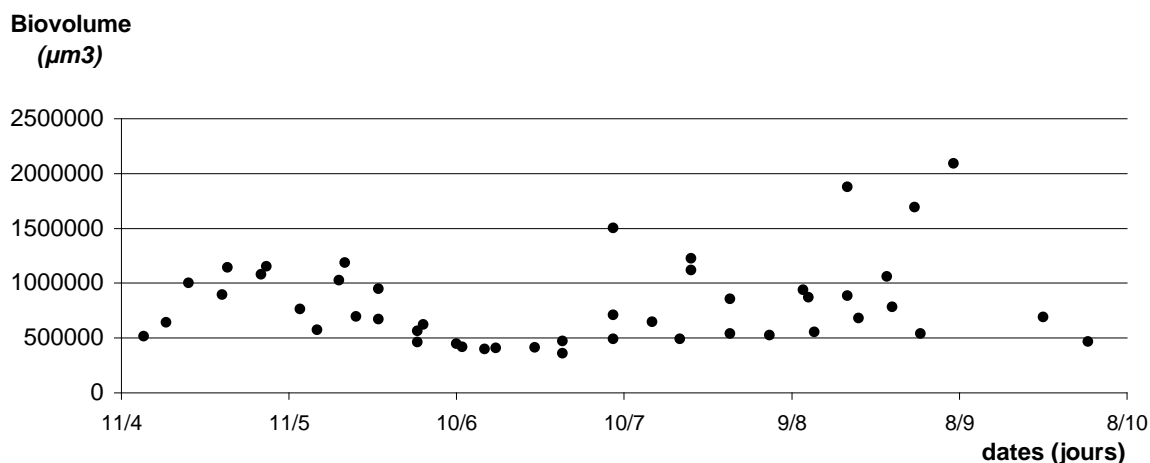


Figure 13 : Fluctuation du biovolume (calculé selon la première formule de RUTTNER-KOLISKO, 1977) de *Brachionus calyciflorus* entre 1993 à 1998.

La figure 13 reprend l'ensemble des données relatives au biovolume de *Brachionus* toutes années confondues. De 1993 à 1998, nous observons le plus souvent une augmentation du biovolume jusqu'en mai. Celle-ci est suivie par une diminution et un minimum en juin.

Dès la fin juin, le biovolume ré-augmente pour atteindre les valeurs plus élevées qu'au printemps, et il ne descend plus jamais sous les 500000 µm³.

4.1.1.2. Liens avec les facteurs environnementaux

Les données hydrobiologiques historiques ont été intégralement transmises par la Compagnie Intercommunale Bruxelloise des Eaux (CIBE) dont la centrale de captage se situe à Tailfer. Le détail de leurs variations a été décrit par VIROUX (2000). La figure 16 (voir p30) met en relation les courbes de tendances ($r^2 > 0.7$) exprimant les variations du débit moyen, de la température moyenne entre 1993 et 1998. L'année 1995 est exclue de ces moyennes par le manque de données morphologiques obtenues. La teneur en Chlorophylle *a* moyenne pour toutes ces années est aussi indiquée.

Les tailles maximales en 1993 sont peut-être liées à la quantité de nourriture moyenne (57,6 µg Chl *a* L⁻¹) plus élevée cette année-là et qui serait proche de l'optimum de taille pour une quantité de nourriture donnée pour *Brachionus calyciflorus* (GALINDO *et al.*, 1993).

La variation de la température en 1994 est la plus réduite (11,4°C). La présence d'*Asplanchna* est aussi plus discrète que les autres années, nous ne le remarquons qu'à la mi-août pour une seule date sur les 18. Le volume en 1994 reste constant même lorsque la quantité de nourriture varie fortement. Il fluctue seulement d'environ 350.000 μm^3 , à comparer aux 700.000 μm^3 en 1997 et 1998.

En 1996, les plus petites formes se rencontrent en septembre. Un développement phytoplanktonique important est marqué à cette époque. Ceci est en accord avec GALINDO *et al.* (1993) selon lesquels la taille de *Brachionus calyciflorus* diminue une fois dépassé une certaine quantité de nourriture optimum.

Les très grandes épines postéro-latérales sont également associées au maximum de températures de l'eau.

Le calcul des coefficients de corrélation tirés des principales relations linéaires testées entre les différents paramètres mesurés et les paramètres environnementaux est synthétisé au tableau 1.

Relation	1993	1994	1996	1997	1998
Température – longueur	0,03	0,05	0,21	0,33	-
Température – largeur	0,03	0,27	0,17	0,60	-
Température – épines	0,30				-
Température – biovolume (A)	0,03	0,11	0,19	0,48	-
Température – biovolume (B)	0,04	0,04	0,18	0,38	-
Chl <i>a</i> – longueur	0,13	0,27	0,06	0,34	0,08
Chl <i>a</i> – largeur	0,17	0,17	0,00	0,14	0,10
Chl <i>a</i> – épines	0,59				0,05
Chl <i>a</i> – biovolume (A)	0,17	0,27	0,06	0,23	0,10
Chl <i>a</i> – biovolume (B)	0,17	0,27	0,10	0,30	0,08
Débit – longueur	0,25	0,00	0,04	0,26	0,02
Débit – largeur	0,41	0,22	0,03	0,54	0,04
Débit – épine	0,16				0,03
Débit – biovolume (A)	0,34	0,02	0,05	0,40	0,03
Débit – biovolume (B)	0,28	-	0,06	0,30	0,02
Longueur - <i>Asplanchna</i>	0,00			0,02	0,33
Largeur - <i>Asplanchna</i>	0,02			0,07	0,26
Biovolume (A) - <i>Asplanchna</i>	0,01			-	0,30
Biovolume (B) - <i>Asplanchna</i>	-			-	0,32
Epines - <i>Asplanchna</i>	0,05			<u>0,97</u>	0,12

Tableau 1 : Valeurs des coefficients de détermination (r^2) des relations linéaires calculées entre plusieurs paramètres environnementaux et les dimensions mesurées chez *Brachionus calyciflorus*. Les coefficients supérieurs à 0.6 sont soulignés. Pour le biovolume, les deux équations de RUTTNER-KOLISKO (1977) sont prises en compte.

Ces données ne permettent pas d'établir un lien factuel entre les variations du milieu et les dimensions mesurées ou les biovolumes calculés. La détermination de la morphologie est donc plus complexe.

4.1.2. *Keratella cochlearis*

4.1.2.1. Variations interannuelles

La figure 14 ci-contre synthétise les variations interannuelles de la morphologie de *Keratella cochlearis* entre 1993 et 1998.

La largeur de *Keratella cochlearis* varie finalement très peu entre 40 et 65 μm de 1993 à 1998.

La moyenne annuelle de longueur augmente de 1993 à 1997 pour redescendre en 1998. Cette chute est en partie liée à l'absence de données pour avril 1998.

Des ANOVA1 accompagnées de contrastes de SCHEFFÉ ont permis d'isoler la morphologie des *Keratella cochlearis* de 1997 de ceux des autres années. En 1997, la longueur est significativement plus grande que les autres années ($> \sim 20\mu\text{m}$). La largeur est également significativement plus élevée. Le biovolume se distingue significativement de ceux de 1993 et de 1994. La taille de l'épine postérieure de *Keratella* est environ 16 μm plus longue en 1997. Cette différence est hautement significative.

La forte hétérogénéité de la variance intra-annuelle pour les différents paramètres ne permet pas de tirer d'autres informations avec les outils statistiques utilisés.

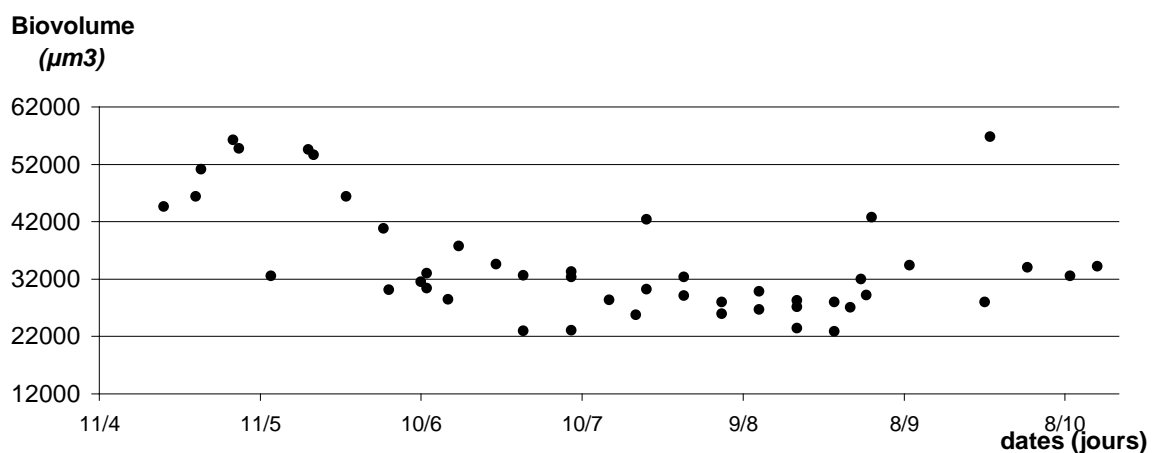


Figure 15 : Fluctuations du biovolume de *Keratella cochlearis* pour les années 1993 à 1998

Le biovolume de *Keratella cochlearis* est maximal fin avril, à près de $56.000 \mu\text{m}^3$. Il se réduit ensuite aux environs de $23.000 \mu\text{m}^3$ pour ré-augmenter à plus de $56.000 \mu\text{m}^3$ fin septembre. Il redescend fin octobre. Les populations printanières sont donc distinctement plus grosses que leurs conspécifiques estivales.

Ces changements de morphologie sont principalement liés à la longueur et semblent se répéter d'année en année.

4.1.2.2. Liens avec les facteurs abiotiques

Le tableau 2 synthétise les principales relations linéaires testées entre les variables abiotiques et les dimensions mesurées et calculées chez *Keratella cochlearis*.

Relation	1993	1994	1996	1997	1998
Température – longueur	0,53	0,51	0,35	<u>0,68</u>	0,18
Température – largeur	0,00	0,04	0,00	0,05	0,18
Température – épine	<u>0,75</u>	0,33	0,49	<u>0,65</u>	0,17
Température – biovolume	0,00	0,30	0,10	0,38	0,20
Chl <i>a</i> – longueur	0,25	0,15	-	0,32	0,52
Chl <i>a</i> – largeur	0,06	0,47	0,03	0,13	0,54
Chl <i>a</i> – épine	0,17	0,06	-	0,38	0,49
Chl <i>a</i> – biovolume	0,01	0,55	0,01	0,34	0,56
débits – longueur	<u>0,85</u>	<u>0,81</u>	0,09	0,43	<u>0,73</u>
débits – largeur	0,06	0,01	0,13	0,03	<u>0,65</u>
débits – épine	<u>0,60</u>	<u>0,87</u>	0,07	0,58	<u>0,74</u>
débits – biovolume	0,10	0,33	0,14	0,09	<u>0,75</u>

Tableau 2 : Valeurs des coefficients de détermination (r^2) des relations linéaires calculées entre plusieurs paramètres environnementaux et les dimensions mesurées chez *Keratella cochlearis*. Les coefficients supérieurs à 0.6 sont soulignés.

Les relations linéaires satisfaisantes entre les paramètres environnementaux et les dimensions mesurées et calculées sont bien plus nombreuses pour *Keratella* que pour *Brachionus*. La longueur de *Keratella* semble ainsi bien corrélée avec le débit.

Ceci peut sous-entendre que l'apparition des différentes formes de *Brachionus* est plus liée à des facteurs génétiques qu'extrinsèques. Une diversité morphologique importante chez *Brachionus* semble acquise indépendamment de la température, du débit ou de la teneur en Chl *a*.

Le facteur qui différencie 1997 des autres années semble principalement la température, comme nous le montre la valeur du coefficient de détermination longueur-température élevé. L'année 1997 est aussi caractérisée par des teneurs moyennes en Chlorophylle *a* excessivement faibles et stables ($3,7\mu\text{g L}^{-1}$) pendant près de six mois.

Les changements de longueur de *Keratella cochlearis* de 1993 à 1998 peuvent être synthétisés sous la forme d'une courbe de tendance dont le coefficient de détermination est de 0,74. Le débit moyen et la température moyenne entre 1993-et 1998 peuvent aussi être représentés par leurs courbes de tendance respectives dont les coefficients de détermination valent 0,7 et 0,95. L'année 1995 est exclue de ces moyennes par manque de données. La teneur en Chlorophylle *a* moyenne pour toutes ces années est aussi indiquée sur une plus longue période afin de bien visualiser son augmentation début avril.

Quatre phases, 1 minimum et deux maxima sont visibles sur le graphe reliant la température moyenne, le débit moyen et la longueur moyenne de *Keratella cochlearis* sur la période étudiée (figure16)

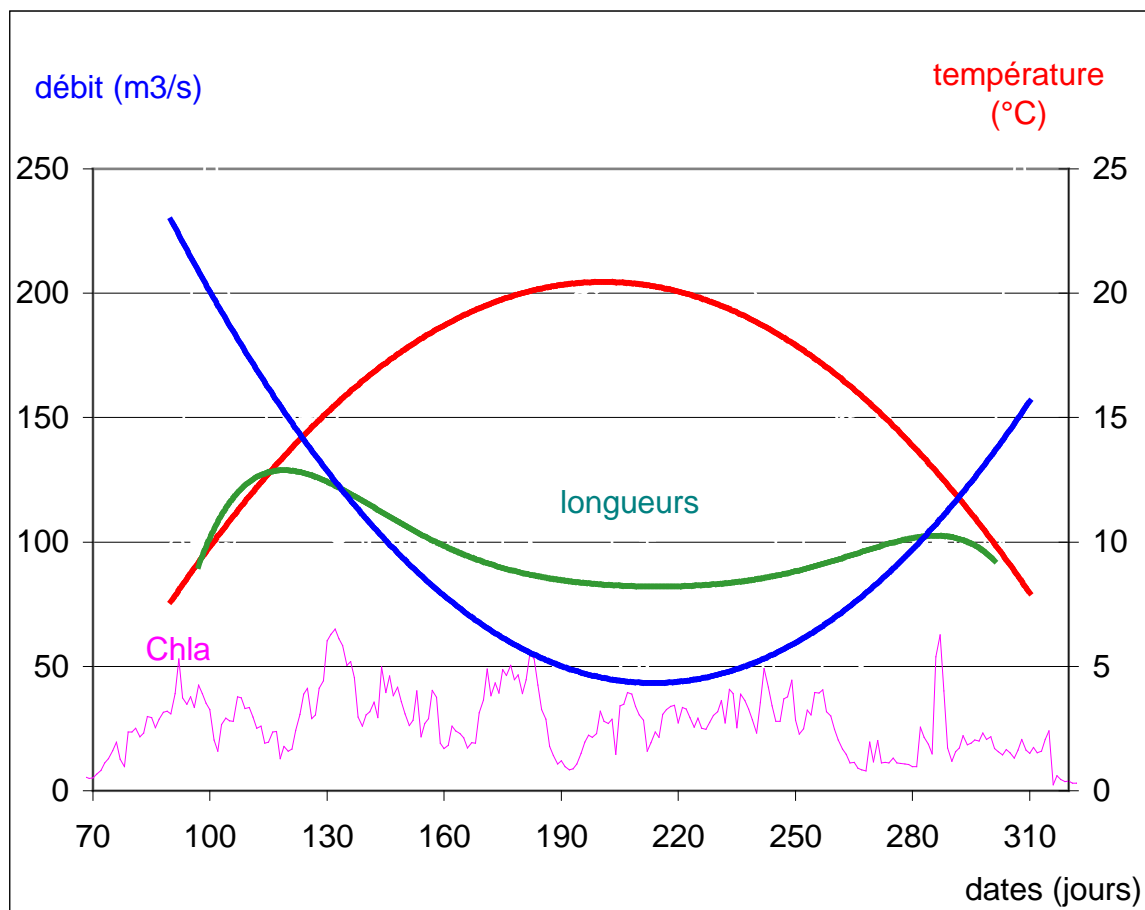


Figure 16 : Graphique mettant en relation les courbes de tendances ($r^2 > 0.7$) exprimant les variations de la longueur de *Keratella cochlearis* (en vert), du débit moyen (en bleu) et de la température moyenne (rouge) entre 1993 et 1998 (excluant 1995). La teneur en Chl *a* moyenne pour toutes ces années (en violet) est aussi indiquée. Les dates sont converties en jours juliens pour mettre toutes les années sur le même graphe.

En avril, les premières formes apparaissent et sont de petite taille, mais ensuite en quelques semaines, la nourriture étant présente en quantité, il y a un changement du phénotype rapides vers des formes plus grandes

Au- dessus d'un seuil nutritif, la température est le facteur essentiel qui contrôle la longueur du corps. Les petites formes se rencontrent en juin lorsque la température est maximale. Les grandes formes s'observent lorsque la température est minimale en accord avec HILLBRICHT-ILKOWSKA (1983).

En octobre, la diminution de la quantité de nourriture sous le seuil optimum pendant un temps assez long peut sans doute aussi avoir causé la diminution de la longueur.

La variation de la longueur et de l'épine de *Keratella cochlearis* peut s'expliquer par des changements phénotypiques d'un même clone liés aux variations de nourriture et de la température. Le genre *Keratella* est en effet connu pour montrer principalement des changements saisonniers de formes, ou pour subir la cyclomorphose (LINDSTRÖM & PEJLER, 1975 ; LINDSTRÖM, 1983 ; NOGRADY, 1993 et références *intra*).

La détermination, pour *Brachionus* et *Keratella*, des dimensions directement mesurables est différente. Alors que *Brachionus* est en partie influencé au niveau de la taille de ses épines postérieures par la présence d'*Asplanchna*, la morphologie générale de *Keratella* est, elle, essentiellement déterminée par le débit et la température dans la Meuse.

4.2. Elevage de *Brachionus calyciflorus* en allopatrie

4.2.1. Succès des éclosions d'œufs de durée

L'éclosion de nombreux organismes après conservations près d'une année dans un frigo à 4°C avec juste un peu d'humidité marque l'énorme faculté de résistance des œufs de durée aux conditions défavorables.

En condition naturelle, en Meuse, les oeufs sont soumis à des changements de la température et de la photopériode qui permettent leur éclosion.

L'eau fraîche et le changement brutal de la température de 4°C à 21°C ont été suffisants pour faire apparaître spontanément divers rotifères comme des bdelloïdes, *Conochilus*, *Euchlanis* ou encore *Brachionus quadridentatus*. Des bdelloïdes sont apparus à chacun des huit sites de prélèvements. *Conochilus* émerge du sédiment du site de Grande-Île, dans une des bouteilles. *Euchlanis* apparaît à Anseremme dans plusieurs boîtes. *Brachionus quadridentatus* est apparu pour Heer-Agimont et Grande-Île.

Les œufs de durée ont également été isolés des sédiments par centrifugation, et des résultats beaucoup plus probants ont été obtenus.

Une semaine après cette opération, beaucoup de rotifères ont émergé ou simplement pu être observés : *Brachionus quadridentatus*, à chaque station, *Notholca* à Houx, *Brachionus angularis* et *Lecane* à Anseremme.

Brachionus calyciflorus notre espèce cible, est finalement apparue aux stations d'Heer-Agimont , d'Anseremme, de la Marina, de Houx et de Grande-île.

Il semble que l'isolement par centrifugation soit préférable pour voir apparaître *Brachionus calyciflorus*. Plus de 100 isollements ont été réalisés et 3 des 21 *Brachionus calyciflorus* qui ont émergé ont pu faire l'objet d'un élevage prolongé.

L'isolement des œufs permet de passer moins de temps à l'observation qui est rendue plus facile. Le contact plus direct eau-œufs, une meilleure perception de la lumière, peuvent expliquer que l'éclosion augmente lorsque nous isolons les œufs pour les incuber. Peut-être que parmi les œufs qui se trouvent dans la Meuse, seuls ceux qui sont amenés à la surface de l'eau peuvent éclore. Les autres sont recouverts par les sédiments. Seul un débit fort accompagné par des turbulences importantes permettent de les remettre à la surface ou en suspension. Les travaux de dragage enlèvent certes beaucoup d'œufs, mais en remettent également d'autres en suspension. Une certaine partie de la diversité renfermée par les banques d'œufs dormants ne s'exprimera donc jamais sauf en circonstance exceptionnelle. L'éclosion n'est pas une affaire simple !

Certains œufs dormants de *Brachionus calyciflorus* éclosent après une semaine. D'autres éclosent après deux ou trois semaines. Beaucoup n'éclosent pas du tout. La sensibilité des œufs aux facteurs extérieurs semble différée. Cette discontinuité temporelle sous entend que les réserves d'œufs au niveau du lit de la Meuse sont constitués d'œufs d'âges distincts

La morphologie comparée des 3 clones provenant de sites distincts est un indicateur supplémentaire de la gigantesque diversité contenue par les sédiments.

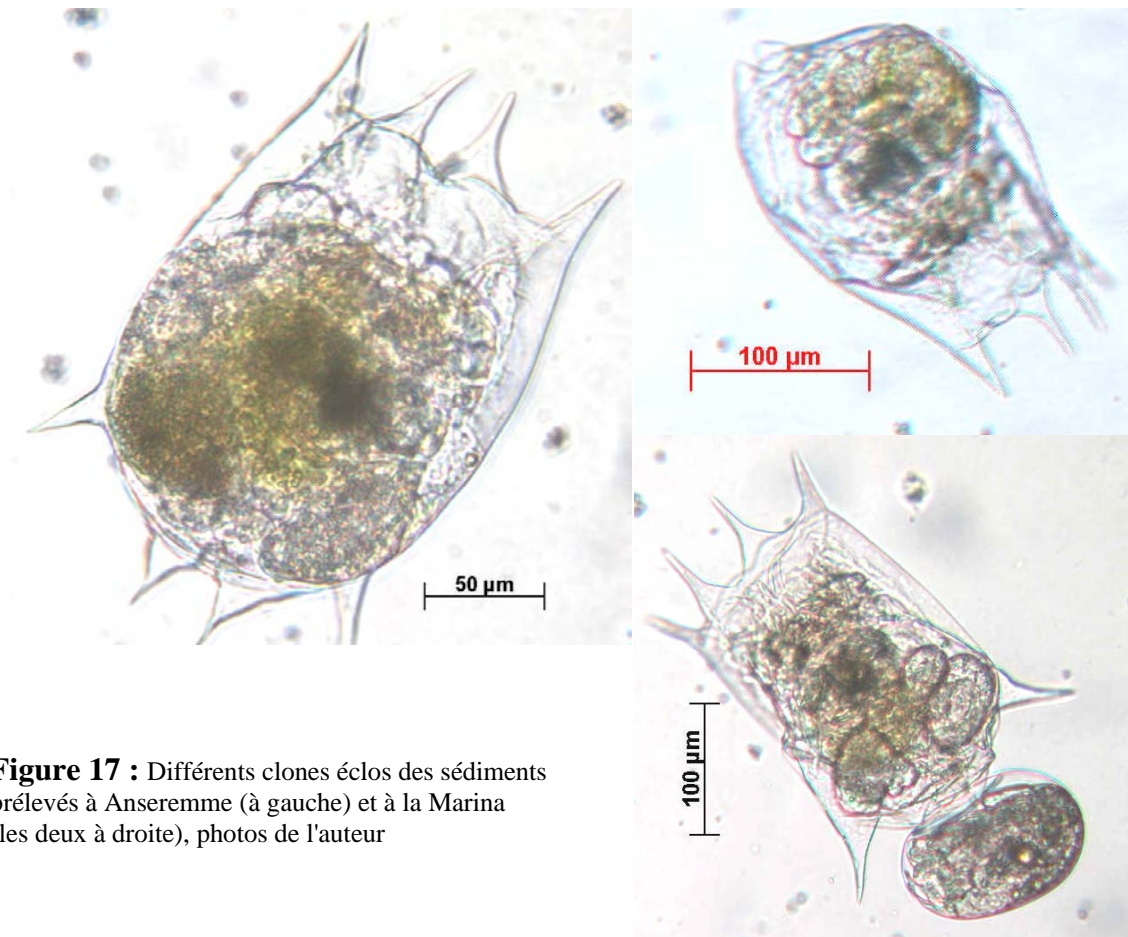


Figure 17 : Différents clones éclos des sédiments prélevés à Anseremme (à gauche) et à la Marina (les deux à droite), photos de l'auteur

Nous observons que la forme des clones varie ainsi que la forme des épines antérieures. La température, la quantité de nourriture et la photopériode qui sont identiques pour tous les clones cultivés, n'en sont pas les causes. L'absence d'épines postéro-latérales pour un des deux clones de la Marina est particulièrement visible. Le clone prélevé à Anseremme était un clone remarquable par sa performance de croissance.

Les différences morphologiques, de vitesses d'éclosion et de croissance entre les clones, alors que les conditions d'élevage sont identiques, prouvent le phénoménal potentiel des sédiments.

La large répartition des sites où écloit *Brachionus calyciflorus* ainsi que d'autres rotifères montre que le lit de la Haute-Meuse est une source autochtone de rotifères à ne surtout pas négliger.

4.2.2. Croissance parallèle de 68 clones

La figure 18 ci-contre synthétise l'information liée à la croissance des 68 clones prélevés en avril 2003 à Tailfer

Parallèlement avec ce qui se passerait dans la nature, nous observons dans la partie supérieure de la figure 20 une érosion des clones importante et constante. Si tous ces rotifères sont issus d'œufs de durée, on peut imaginer une diversité initiale énorme, qui est réduite de plus en plus au fil du temps.

Nous observons ici ce phénomène d'érosion en conditions constantes de photopériode, de régime alimentaire, et de température. Imaginons là en Meuse où la compétition entre les clones vient s'ajouter! Inversement, de nombreux clones auraient pu trouver une nourriture plus diversifiée en Meuse et leur survie aurait pu y être meilleure.

Dans la seconde partie de la figure, nous voyons la croissance individuelle totale des clones. Celle-ci commence réellement à être appréciable un petit mois après le début de l'isolation. Une période d'acclimatation prolongée est visible.

Dans la dernière partie, nous présentons la composition relative des effectifs. Une grande variabilité dans la croissance apparaît. Certains clones croissent fortement, d'autres moins vite, certains restent à l'unité pendant de nombreux jours avant de disparaître ou d'enfin « exploser », d'autres disparaissent rapidement.

4.2.3. Croissance de la totalité des clones.

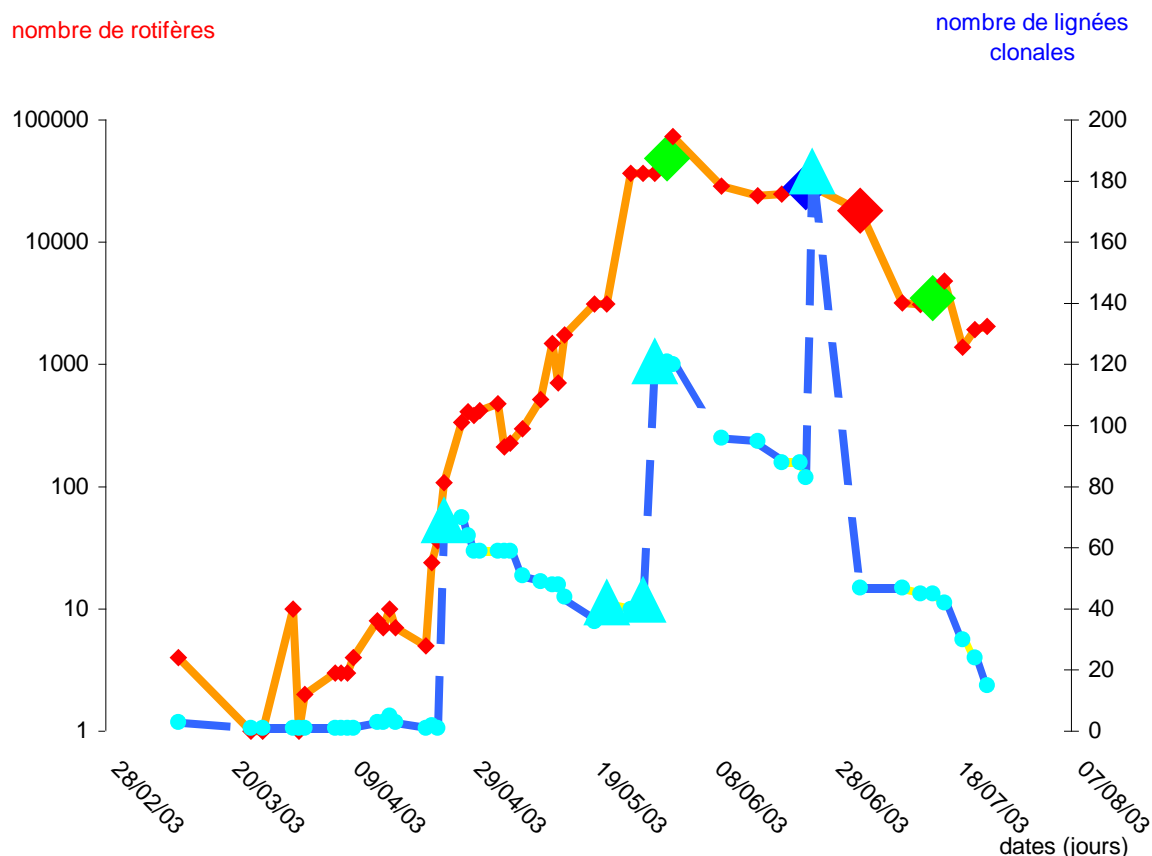


Figure 19 : Représentation de la croissance des individus (en rouge) et de la survie des clones (en bleu). Les losanges verts représentent les chocs de températures liées aux pannes de l'incubateur, le losange bleu correspond à la détection d'une contamination algale, le losange rouge aux prélèvements de matériel pour les électrophorèses (~15000 rotifères), les triangles bleus correspondent à l'ajout de clones prélevés en Meuse. Les losanges verts signalent les pannes inopinées de la chambre thermostatée !

Cette figure 19 est développée dans les paragraphes ultérieurs. Elle résume l'ensemble de notre élevage et intègre les 246 clones au total que nous avons isolés.

Le premier mois sur cette figure synthétise les résultats obtenus par l'éclosion des oeufs de durées, et notre difficulté à les faire pousser. Un seul clone que nous avons isolé à partir des sédiments d'Anseremme écrase la croissance individuelle des autres clones isolés et prélevé en Meuse. Un clone sur un total de 246 a donc une croissance remarquable. Sa capacité à s'adapter à différentes sources de nourriture, à être peu sensible à la manipulation, à croître dans toutes les formes de contenants le désigne comme un clone de laboratoire potentiel.

Nous observons que l'inoculation de nouveaux clones en conditions allopatriques permet le maintien d'une croissance individuelle importante et réduit l'érosion clonale. Dans la nature, des inoculations temporellement distantes soutiennent-elles aussi les populations de rotifères ?

4.2.4. Illustrations photographiques de la variabilité

Nous présentons ici la diversité liée à la récolte et à l'élevage de 2003 via quelques photographies. Ces clichés sont obtenus à l'aide d'une caméra AXIOCAM (Zeiss) adaptée sur le microscope inversé Leica DMIL utilisé pour la biométrie, et pilotée par le logiciel AxioVision.

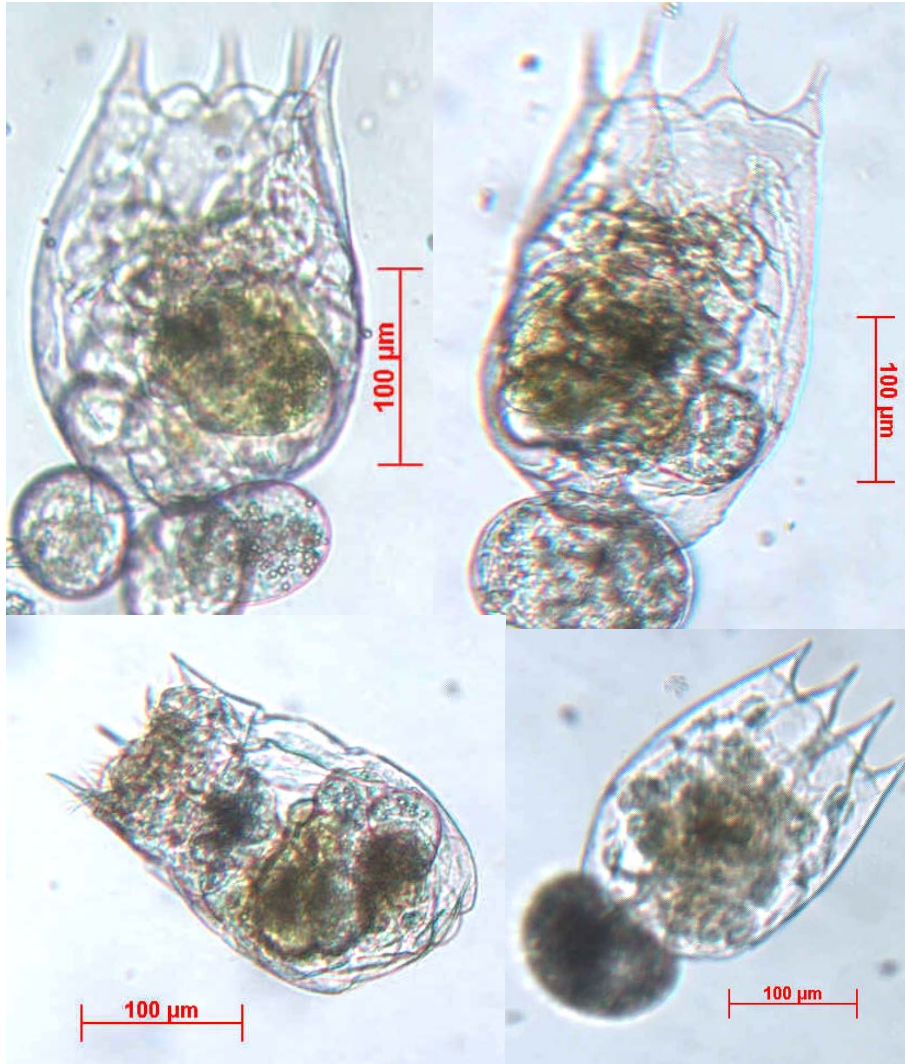


Figure 20: *Brachionus calyciflorus* prélevés le 25 avril 2003 à Tailfer ; photos de l'auteur

Nous voyons que la longueur et la largeur varient entre différents clones capturés au même moment et élevés dans les mêmes conditions. (température, nourriture, et photopériode)

Les clones élevés en laboratoire en conditions optimales de nourriture voient leur taille grandir (GALINDO *et al*, 1993). Par rapport aux mesures précédentes de 1993 à 1998, où nous calculions un volume en Avril de $520.000 \mu\text{m}^3$, nous avons photographié après un élevage de plus de deux mois des rotifères de près de $1.900.000 \mu\text{m}^3$.

Une certaine variabilité au niveau des épines postéro-latérales de *Brachionus calyciflorus* existe aussi. Une petite expérience répétée a permis de montrer l'apparition d'épines postéro-latérales chez 25 individus n'en possédant pas initialement, lorsqu'ils sont mis en présence de 3 prédateurs (*Asplanchna*).

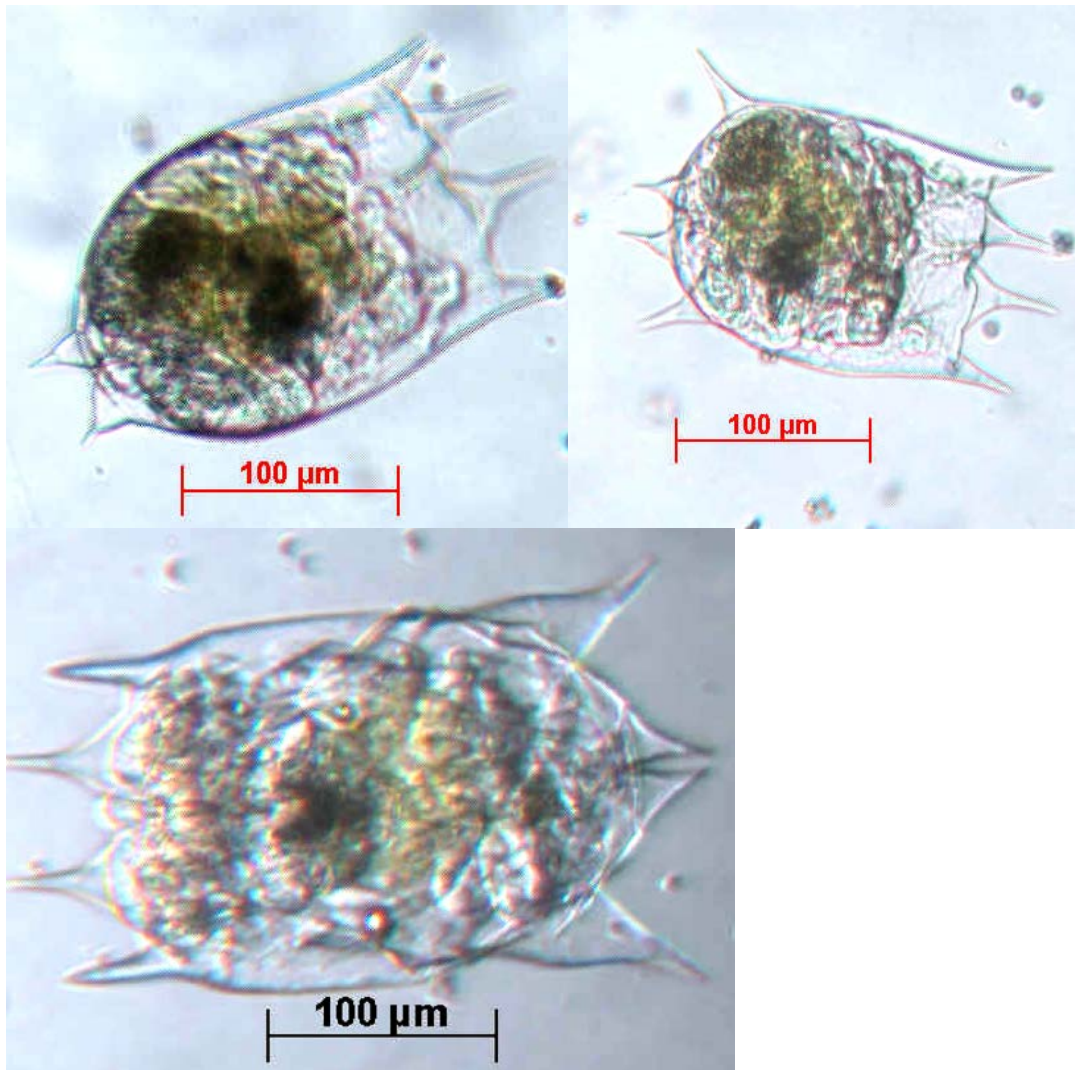


Figure 21: *Brachionus calyciflorus* capturés le 25/04/03 à Tailfer, sans et avec différentes extensions des épines postéro-latérales. Photos de l'auteur.

Alors qu'ils sont à température, régime alimentaire identique et photopériode constante, 48% des clones (11/23) prélevés à Tailfer en 2003, élevés et photographiés possèdent des épines, et cela en absence de prédateur. Certains clones n'« économisent » donc pas leur énergie, et fabriquent toujours des épines. Ils paraissent avoir un génotype stéréotypé. Les autres préfèrent probablement économiser leur énergie et la diriger vers d'autres fonctions vitales comme la recherche de nourriture tout en pouvant lorsque la situation la demande s'adapter rapidement. Ces autres clones ont un génotype plus 'flexible'.

4.2.5. Remarques méthodologiques sur l'élevage clonal de *Brachionus*

4.2.5.1. La culture des algues :

Euglena gracilis est l'algue avec laquelle nous avons d'abord essayé de faire pousser les clones de *Brachionus calyciflorus*. Elle présentait l'avantage d'être toujours en suspension comme les rotifères, et de ne pas demander de bullage. Sa facilité de culture l'indique comme la meilleure algue pour l'élevage de *Brachionus*. Elle n'a toutefois pas permis la croissance espérée des clones qui ont été rapidement adaptés à *Dictyosphaerium erhenbergianum*, et une croissance meilleure s'amorça rapidement. Nous aurions pu commencer directement avec *Dictyosphaerium*, qui se rapprochent des *Chlorella* conseillées par différents auteurs comme supérieures pour l'élevage (POURRIOT, 1965), mais d'autres auteurs ont eux utilisés fort avantageusement *Euglena gracilis* comme GILBERT (1970, 1983). Il est apparu que notre souche était probablement de trop grande dimension pour être facilement consommée par *Brachionus*.

La productivité spectaculaire d'un seul clone, provenant du sédiment d'Anseremme engouffra rapidement nos cultures de *Dictyosphaerium erhenbergianum*. Disposant d'*Euglena* en quantité nous avons décider d'en donner partiellement à ce clone 'glouton'. Celui-ci atteint alors plus de 60.000 individus.

4.2.5.2. La récolte

Les sites de Waulsort et de Tailfer sont idéaux en terme de distances et de représentativité du bassin mosan. Ils intègrent chacun une partie différente de ce bassin. La 'passerelle' au dessus de la Sambre à Namur prime, elle par sa grande proximité des facultés.

L'isolement s'est avérée être l'étape la plus critique du processus. Une première sortie en Mars fut infructueuse liée à la température de l'eau trop basse. Une seconde récolte en Avril permit d'isoler les 68 rotifères mentionnés plus haut, à Tailfer. En mai, trois sorties furent nécessaires pour obtenir 2 clones pour Waulsort et 6 clones pour Tailfer. La sortie en Sambre fournit une centaine de clones, dont 48 poussèrent de manière satisfaisante. La sortie en juin fut prolifique puisque nous avons réussi à isoler une centaine de rotifères de Tailfer et cela en moins de temps que d'habitude.

La présence d'espèces morphologiquement proches de *Brachionus calyciflorus* ainsi que sa densité variable ont complexifié nos recherches.

4.2.5.3. L'élevage en lui-même.

L'élevage des rotifères prélevés '*in situ*' apparaît beaucoup plus aléatoire et surtout moins rapide que celui de clones de laboratoires sélectionnés. Si on observe la figure 21, nous apercevons la réduction du nombre d'individus en début mai liée à l'absence de renouvellement du milieu à ce moment.

Nous avons observé la fragilité extrême des rotifères lors d'un brusque changement de température (10°C en quelques heures), situation qu'ils ne connaissent jamais dans la nature.

Nous avons constaté des exceptions à la méforme générale, des clones qui se mettent subitement à croître. Ceci est clairement perceptible sur la figure 21 fin juillet : nous y voyons peu de clones et pourtant toujours plus de 1000 rotifères.

Le plus souvent, directement après le choc, le nombre total de rotifères continue à augmenter, c'est ensuite que nous observons l'apparition de mâles et enfin des œufs de durée. Ces œufs risquent d'éclore et d'introduire de la variabilité intempestive. Il faut donc renouveler le milieu, en veillant à les écarter. Une fois accomplie cette tâche, il n'est pas encore certains qu'il reste des femelles prêtes à se reproduire ! Lorsque ce processus s'enclenche, le clone mère périlite le plus souvent. Les femelles mictiques, une fois accomplie leur tâche qui est de produire des œufs méiotiques destinés à la dormance, ne sont pas capables de pondre des œufs mitotiques ! Certains clones meurent directement alors que d'autres contribuent à la production de nombreux œufs de durées avant de disparaître.

Ces œufs, il est à remarquer, ont éclos lorsque nous les avons replacés dans des conditions adéquates. Ceci constitue une superbe preuve de la résistance des rotifères et de leur persistance dans un milieu même artificiel.

Une contamination liée à nos cultures algales est intervenue fin juin, et a causé la diminution et la disparition de beaucoup de lignées. Des champignons couvraient rapidement les algues et empêchaient la nutrition des rotifères. La source de ce problème a été trouvée dans la culture de *Dictyosphaerium*, malgré les précautions au repiquage et la pauvreté du milieu de culture. Celles-ci ont dû être re-démarrées à partir d'une réserve sur agar, non contaminée. En attendant le redémarrage, une solution complémentaire fut prise : après la centrifugation, nous laissons nos algues reposer plusieurs heures avant de les donner aux rotifères. Les contaminants sédimentaient plus vite, et nous pouvions donner le surnageant plus ou moins sans problèmes ensuite.

Avec un renouvellement régulier tous les deux jours des boîtes même le week-end, nous avons réussi à réobtenir une croissance positive.

Hélas, c'était sans compter le temps caniculaire de juillet 2003 et une deuxième panne de l'incubateur qui mis fin à tous nos espoirs d'atteindre une production suffisante pour obtenir plus de clones pour l'étape d'électrophorèse qui constituait le troisième volet de ce travail. Malgré un transfert rapide en chambre à 20 °C pour limiter le choc de température, le mal était fait et la grande majorité des clones subsistants entrèrent en reproduction sexuée et périclitèrent endéans deux semaines.

La variabilité étonnante dans la réponse aux chocs de température, la différence de croissance entre les clones, leur morphologie différente, tout cela concorde vers l'idée d'une diversité clonale importante chez *Brachionus calyciflorus* en Meuse.

4.3. Premières données issues de l'analyse des allozymes chez *Brachionus calyciflorus*

Afin de préciser cette diversité, environ 15.000 rotifères représentant 8 clones ont été utilisés et récoltés (figure 21, losange rouge) afin d'évaluer le polymorphisme enzymatique. Malgré une croissance inférieure au niveau de 2000 individus recommandé (GÓMEZ, 1998) nous avons pris de risque de procéder au sacrifice des animaux, à l'extraction et à la migration.

Nous avons trouvé pour 3 des 4 enzymes testées (MDH, malade déhydrogénase, ; ME, enzyme malique et PGD, phosphogluconate déhydrogénase) le même nombre de *loci* que GÓMEZ (1998) pour *Brachionus plicatilis*, à savoir 2 (MDH), et 1 (ME et PGD).

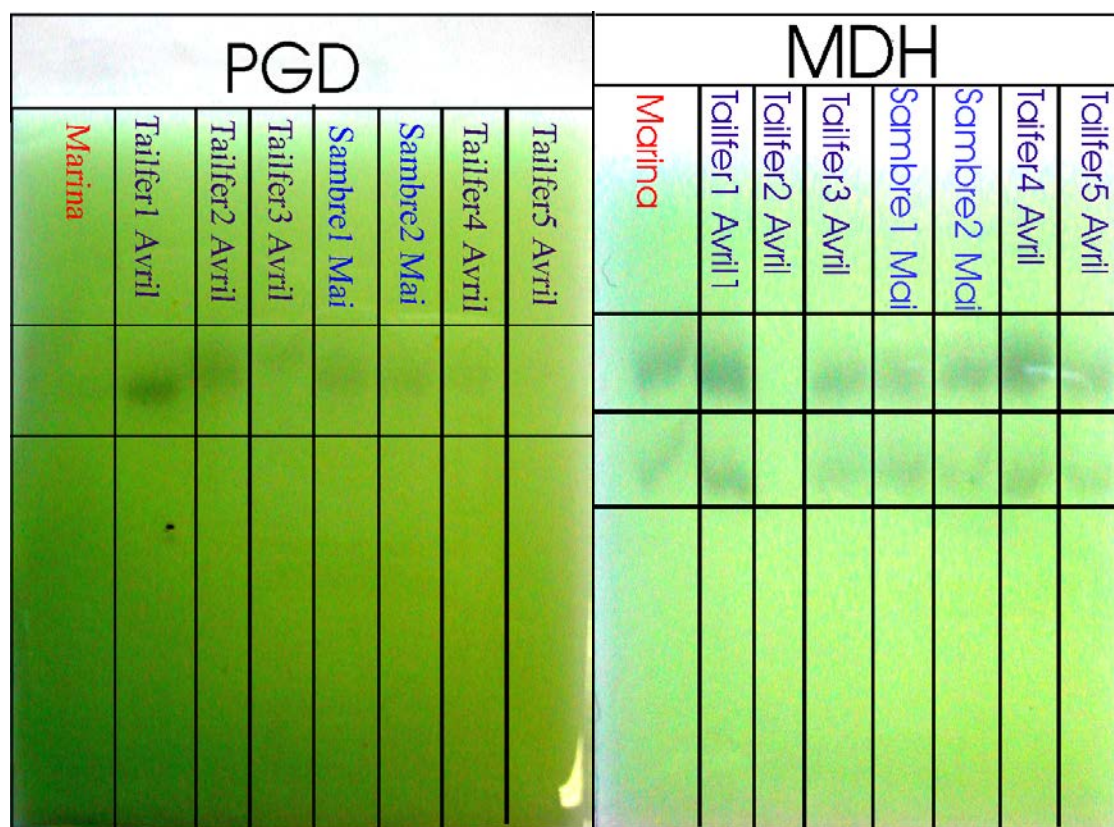


Figure 22 : Gels obtenus pour la PGD et la MDH + localisation et datation des clones. La bande « Marina » désigne un clone qui provient des sédiments prélevé en 2001 au site du même nom.

Les résultats obtenus (Figure 22) nous permettent de montrer l'existence de 2 *loci* pour la MDH (gel de droite) et de 1 locus pour la ME (gel non représenté) ainsi que pour la PGD (gel de gauche).

L'observation la plus intéressante est la présence de 3 bandes migrant à des distances différentes pour trois clones de Tailfer en avril sur le gel PGD (bandes 2 à 4). Ces clones sont électrophorétiquement distincts pour cette enzyme, et sont donc différents génétiquement malgré qu'ils ont été prélevés à la même date.

Ceci est en faveur de l'hypothèse d'un mélange de clones plutôt qu'à celle d'une population monoclonale énorme.

Nous avons noté l'absence totale de coloration pour la LDH (lactate déhydrogénase) et ceci malgré l'emploi de la recette adéquate de révélation. Les recettes histo-chimiques des autres enzymes ont pourtant des composants en communs avec celle-ci. Trois essais avec des quantités d'enzymes différentes appliquées sur le gel n'ont pas permis de révéler un patron de bandes interprétable.

Une autre limite actuelle de notre protocole d'électrophorèses est notre incapacité à déterminer quelles sont les enzymes présentes sous forme de monomères, dimères ou tétramères, et la présence d'hétérozygotes. Une observation rapide des deux gels proposés à la lecture montre en effet l'absence de patrons complexes (au minimum double bande par locus), quoique dans le cas de la MDH les bandes soient encore trop floues que pour être interprétées correctement.

Nous avons pu tester partiellement 8 clones sur les 246 prélevés en Meuse. Ces résultats ne représentent qu'une infime portion des rotifères qui ont fait l'objet d'un élevage, eux-mêmes une fraction des populations présentes *in situ*. Pourtant déjà nous avons pu visualiser la coexistence de clones différents à une même date prélevé en un même endroit (Tailfer). La diversité rencontrée en Meuse doit donc être plus importante. Nos observations vont dans le sens du second modèle théorique de KING & ZHAO (1987) de la discontinuité génétique incomplète.

5. Discussion générale, conclusions et perspectives

Nos illustrations photographiques permettent à elles seules d'imaginer facilement l'importante diversité parmi les populations de *Brachionus calyciflorus* dans la Meuse.

La principale question que nous nous posions était de savoir si une population prélevée en Meuse est constituée d'un seul clone bien adapté ou au contraire d'un mélange de clones.

L'étude biométrique sur six années de prélèvements ne nous a pas permis d'établir un lien entre les variations du milieu et les dimensions mesurées de *Brachionus calyciflorus*. La détermination de sa morphologie n'est pas prévisible avec les seules données que nous possédons.

La morphologie de *Brachionus* est en partie influencée par la présence du prédateur *Asplanchna* ce qui concorde avec des auteurs comme KERFOOT (1980) et GILBERT (1983). D'autres paramètres autres que la température, le débit ou la quantité de nourriture doivent l'influencer. Nous avons montré qu'une diversité morphologique importante existe chez *Brachionus calyciflorus* en Meuse.

Il a été démontré l'existence de plusieurs espèces "soeurs" de *Brachionus plicatilis*, possédant des caractéristiques morphologiques fines distinctes (SERRA & MIRACLE, 1983, 1987). Il est possible que nous soyons également en face d'une série d'espèces différentes bien que de morphologie très semblable dans le cas de *Brachionus calyciflorus*.

La morphologie générale de *Keratella* est, elle, bien plus fortement déterminée par le débit et la température. Cette relation avec la température est connue depuis de nombreuses années. (PEJLER, 1980; HILLBRICHT-ILKOWSKA, 1983; LINDSTRÖM, 1983; GREEN, 1987). L'influence marquée du débit est plus surprenante. Ceci est sans doute dû au peu d'étude sur le plancton fluvial. Le débit intervient peut-être sur la morphologie de *Keratella* en modifiant la turbulence du milieu. Il a été très récemment montré que *Keratella cochlearis* n'est en fait pas un taxon monophylétique (DERRY *et al.*, 2003). Peut-être, de nouveau, avons-nous affaire à plusieurs "espèces" en Meuse? Peut-être aussi, au contraire, s'agit-il de clones différents d'une seule espèce *Keratella* qui expliquent une partie des fluctuations observés.

Les élevages en conditions contrôlés montrent une érosion clonale importante. La vie des rotifères en Meuse est pourtant beaucoup plus complexe que celle dans un incubateur. La température, la photopériode ainsi que la disponibilité en nourriture varient. La compétition apparaît, ainsi que la prédation.

L'application partielle des techniques présentées par MAY (1987) pour isoler les oeufs de rotifères du sédiments a permis d'obtenir des résultats intéressants. La large répartition des sites où éclorent *Brachionus calyciflorus* ainsi que d'autres rotifères montre que le lit de la haute Meuse est une source autochtone de rotifères à ne pas négliger.

La variabilité génétique des rotifères n'étant pas visible directement par un examen morphologique, il nous était indispensable de recourir à une technique comme celle des allozymes pour la distinguer. Cette technique est la première à avoir été appliquée chez *Brachionus plicatilis* (SERRA & MIRACLE, 1985; GÓMEZ, 1998). Son application ici chez *B. calyciflorus* fournit déjà quelques résultats, même sommaires.

Nous avons révélé une partie de la variabilité génétique cachée chez les 8 clones les plus prolifiques en utilisant les allozymes. Plusieurs allèles (3) pour la PGD montrent que au moins trois ensembles de clones coexistent au même moment (avril) à Tailfer. La réponse à notre question principale est donc que nous sommes en présence d'un mélange de clones. Il nous reste à quantifier la composition relative de ce mélange. Cela constituera sans nul doute l'objet d'autres travaux.

L'étude de la quantification de la diversité au sein de la Meuse se doit d'être poursuivie. La connaissance des nombreux problèmes que nous avons eu et les moyens que nous avons trouvés pour y remédier peuvent servir.

Lorsque nous aurons suffisamment de données sur la composition allélique, il sera intéressant de réaliser une étude statistique tel qu'un cluster pour séparer les clones de morphologies différentes et les mettre en relation avec des compositions alléliques. Une analyse discriminante permettrait peut-être d'assigner une morphologie à une composition allélique.

Il serait opportun de refaire des prélèvements en Meuse lors du chômage technique prochain de 2004, pour tirer d'autres enseignements précieux sur les œufs dormants en Meuse. Une étude plus importante peut-être envisagée, la technique d'isolation des œufs étant parfaitement au point et pouvant être appliquée intensivement en un court temps. Nous pourrions mesurer la densité et la diversité au sein des œufs dans des stations distinctes. Nous pourrions comparer le temps d'éclosion à plusieurs températures.

Notre confiance dans l'électrophorèse pour déterminer la variation chez les rotifères est toujours entière. Les microsatellites dont l'utilisation est encouragée par MILINKOVITCH dans un article de LAMBERT (2003) seraient pourtant une alternative excellente. Ceux-ci évitent l'étape d'élevage clonal (1 individu par clone suffit) qui pose de nombreux problèmes vu la sensibilité des animaux aux moindres variations.

Nous pouvons dire que nos observations sur les différences morphologiques, la croissance individuelle des clones dans des conditions d'élevage identiques, ainsi que les données disponibles sur le polymorphisme enzymatique concordent tous vers l'existence d'une diversité élevée chez *Brachionus calyciflorus* en Meuse.

Le modèle théorique proposé par KING (1972, 1977) de la discontinuité génétique incomplète semble adapté à la Meuse. La coexistence de clones y a été montrée.

Nous ne pouvons préciser si les rotifères se distinguent génétiquement selon l'endroit où ils éclosent. Il existe sans doute des variations au sein même d'une réserve d'œufs de durée en un endroit donné. Ces changements doivent être plus spectaculaires vers l'embouchure de la Meuse, là où des œufs dormants d'origines plus diverses ont pu s'accumuler. L'étude de l'origine géographique du plancton mosan demandera encore de nombreuses années de recherche.

6. Bibliographie

1. BROOKS, J.L. & S.I. DODSON (1965) : Predation, body size, and composition of plankton – *Science* 150 :28-35.
2. CIROS-PÉREZ, J., A. GÓMEZ & M. SERRA (2001) : On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. – *J. Plankton Res.* 23(12): 1311-1328.
3. DE BEAUCHAMP, P. (1952) : Un facteur de la variabilité chez les rotifères du genre *Brachionus* - *C.R. Acad. Sci.* 235: 1355-1356.
4. DERRY, A.M., P.D.N. HEBERT & E.E. PREPAS (2003) : Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes : A molecular phylogenetic approach – *Limnol. Oceanogr.* 48(2): 675-685.
5. DIEGUEZ, M., B. MODENUTI, & C. QUEIMALINOS (1998) : Influence of abiotic and biotic factors on morphological variation of *Keratella cochlearis* in a small Andean lake - *Hydrobiologia* 387/388: 289-294.
6. FANESTIL, D.D. & C.H. BARROWS, Jr. (1965) : Ageing in the rotifer – *J. Gerontol.* 20:462-469.
7. GALINDO, M.D. & C. GUISANDE (1993) : The reproductive biology of mictic females in *Brachionus calyciflorus* PALLAS - *J. Plankton Res* 15(7): 803-808.
8. GALINDO, M.D., C. GUISANDE & J. TOJA (1993) : Reproductive investment of several rotifer species – *Hydrobiologia* 255/256 : 317-324.
9. GALKOVSKAYA, G. (1983) : On temperature acclimation in an experimental population of *Brachionus* - *Hydrobiologia* 104: 225-227.
10. GILBERT, J.J. (1967) : *Asplanchna* and postero-lateral spine production in *Brachionus calyciflorus* – *Arch. Hydrobiol.* 64: 1-62.
11. GILBERT, J.J. (1970) : Monoxenic cultivation of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a defined medium - *Oecologia* 4: 89-101.
12. GILBERT, J.J. (1974) : Dormancy in rotifers - *Trans. Am. Micros. Soc.* 93(4): 490-513.
13. GILBERT, J.J. (1980) : Observations on the susceptibility of some protists and rotifera to predation by *Asplanchna girodi* – *Hydrobiologia* 73: 87-91.
14. GILBERT, J.J. (1983) : Control of sexuality in *Asplanchna brightwelli* - *Hydrobiologia* 104: 167-173.

15. GILBERT, J.J. (1995): Structure, development and induction of a new diapause stage in rotifers - *Freshwat. Biol.* 34: 263-270.
16. GILBERT, J.J. (2001) : Spine development in *Brachionus quadridentatus* from an Australian billabong: genetic variation and induction by *Asplanchna* – *Hydrobiologia* 446/447: 19-28.
17. GÓMEZ, A. (1998) : Allozyme electrophoresis: its application to rotifers - *Hydrobiologia* 387/388: 385-393.
18. GÓMEZ, A. & G.R. CARVALHO (2000) : Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations - *Mol. Ecol.* 9: 203-214.
19. GÓMEZ, A. & M. SERRA (1996) : Mate choice in male *Brachionus plicatilis* rotifers – *Funct. Ecol.* 10: 681-687.
20. GÓMEZ, A., M. TEMPRANO & M. SERRA (1995) : Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. - *J. Evol. Biol.* 8: 601-622.
21. GÓMEZ, A., C. CLABBY & G.R. CARVALHO (1998) : Isolation and characterisation of microsatellite *loci* in a cyclically parthenogenetic rotifer, *Brachionus plicatilis* - *Mol. Ecol.* 7 : 1619-1621.
22. GREEN, J. (1987) : *Keratella cochlearis* in Africa - *Hydrobiologia* 147: 3-8.
23. GUISANDE, C. & N. MAZUELOS (1991) : Reproductive pattern of *Brachionus calyciflorus* Pallas at different food concentrations – *J. Plankton Res.* 13(2): 279-286.
24. HALBACH, U. & G. HALBACH-KEUP (1974) : Quantitative Beziehungen zwischen Phytoplankton und der Populationsdynamik des Rotators *Brachionus calyciflorus* Pallas - *Arch. Hydrobiol.* 73: 273-309.
25. HILLBRICHT-ILKOWSKA, A. (1983) : Variation morphologique de *Keratella cochlearis* dans le lac Biwa, Japon - *Hydrobiologia* 104 : 297-305.
26. HERZIG, A. (1983) : Comparative studies on the relationship between temperature and duration of embryonic development of rotifers - *Hydrobiologia* 104: 237-246.
27. HERZIG, A. (1987) : The analysis of planktonic rotifer populations: A plea for long-term investigations- *Hydrobiologia* 147: 163-180.
28. JOAQUIM-JUSTO, C. (1992) : Influence du taux de "grazing" sur la dynamique de transfert des PCB chez une espèce de rotifère zooplanctonique, *Brachionus calyciflorus* Pallas, Mémoire de licence en Sciences Zoologiques, Université de Liège, 55p.

29. KERFOOT, W.C. (1980). Perspectives on cyclomorphosis. Separation of phenotypes and genotypes - *in* KERFOOT, W.C. (ed.), The Evolution and Ecology of Zooplankton Communities, University Press of New England, Hanover NH, USA, pp. 470-496.
30. KING, C.E. (1972) Adaptation of rotifers to seasonal variation - *Ecology* 53: 408-418.
31. KING, C.E. (1977) : Genetics of reproduction, variation, and adaptation in rotifers - *Arch.Hydrobiologie. Beih*, 8: 187-201.
32. KING, C.E. & M.R. MIRACLE (1980) : A perspective on aging in rotifers - *Hydrobiologia* 73: 430-435.
33. KING, C.E. & T.W. SNELL (1980) : Density-dependant sexual reproduction in natural populations of the rotifer *Asplanchna girodi* - *Hydrobiologia* 73: 149-152.
34. KING, C.E. & Y. ZHAO (1987) : Coexistence of rotifer clones in Soda Lake, Nevada - *Hydrobiologia* 147: 57-64.
35. LAMBERT, P. (2003) : Le nouvel âge de la biologie évolutive - *Athena* 190 : 398-403.
36. LINDSTRÖM, K.(1983) : Changes in growth and size of *Keratella cochlearis* in relation to some environmental factors in cultures - *Hydrobiologia* 104: 325-328.
37. LINDSTRÖM, K. & B. PEJLER (1975) : Experimental studies on the seasonal variation of the rotifer *Keratella cochlearis* - *Hydrobiologia* 46: 191-197.
38. LOXDALE, H.D. & G. LUSHAI (1998) : Molecular markers in entomology - *Bulletin of entomological Research* 88: 577-600.
39. MAY, L. (1987) : Effect of incubation temperature on the hatching of rotifer resting eggs collected from sediments - *Hydrobiologia* 147:335-338.
40. MAYENNE, T. (1993) : Réalisation de cultures d'algues (*Dictyosphaerium ehrenbergianum*, ...) en vue d'une expérimentation sur le broutage par le zooplancton, Mémoire de Graduat en Biologie, Institut Supérieur Catholique de Fleurus.
41. MINKOFF, G., E. LUBZENS & D. KOHAN (1983) Environmental factors affecting hatching of rotifer resting eggs - *Hydrobiologia* 104: 61-69.
42. MOURELATOS, S., POURRIOT, R. & C. ROUGIER(1991) Taux de filtration du rotifère *Brachionus calyciflorus* : Comparaison des méthodes de mesures ; influence de l'âge. - *Vie et Milieu* 40: 39-43.
43. NOGRADY, T. (1993) : Rotifera, Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World, vol.4, SPB Academic Publishing bv, Amsterdam, Pays-Bas, 142p.

44. PEJLER, B. (1980) : Variation in the genus *Keratella* - *Hydrobiologia* 73: 207-213.
45. POURRIOT, R (1965) : Recherches sur l'écologie des rotifères, Vie et milieu Suppl.21,, 21. Masson & Cie, Paris, 223p.
46. POURRIOT, R (1973) : Rapports entre la température, la taille des adultes, la longueurs des oeufs et le taux de développement embryonnaire chez *Brachionus calyciflorus* Pallas - *Ann. Hydrobiol.* 4(1) : 103-115.
47. POURRIOT, R. & P. CLEMENT (1982): Action de facteurs externes sur la reproduction et le cycle reproducteur des rotifères – *Acta Oecol./Oecol. Gener.* 2(2) : 135-151.
48. POURRIOT, R. & C. ROUGIER (1999) : Température, démographie et mixis chez un rotifère héléoplanctonique, *Epiphanes brachionus* (Ehrb.) – *Annls. Limnol.* 35(3) : 167-172.
49. POURRIOT, R.& T.W.SNELL (1983) : Resting eggs in rotifers - *Hydrobiologia* 104: 213-224.
50. RICO-MARTINEZ, R. & S.I. DODSON (1991) : Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas – *Aquaculture* 105 : 191-199.
51. ROTHHAUPT, K. (1985) : A model approach to the population dynamics of the rotifer *Brachionus rubens* in two-stage chemostat culture – *Oecologia* 65: 252-259.
52. ROTHHAUPT, K. (1990) : Population growth rates of the closely related species ; effects of food quantity, particule size and nutritional quality – *Freshwat. Biol.* 23: 561-570.
53. RUTTNER-KOLISKO, A. (1977) : Suggestions for biomass calculation of plankton rotifers - *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8 : 71-76.
54. SERRA, M. & M.J. CARMONA (1993): Mixis strategies and resting egg production of rotifers living in temporally-varying habitats - *Hydrobiologia.* 255/256, 117-126.
55. SERRA, M. & M.R. MIRACLE (1983) : Biometric analysis of *Brachionus plicatilis* ecotypes from Spanish lagoons - *Hydrobiologia.* 104: 279-291.
56. SERRA, M. & M.R. MIRACLE (1985) : Enzyme polymorphism in *Brachionus plicatilis* populations from several Spanish lagoons - *Verh. Int. Verein. Limnol.* 22: 2991-2996.
57. SERRA, M. & M.R. MIRACLE (1987) : Biometric variation in three strains of *Brachionus Plicatilis* as a direct response to abiotic variables - *Hydrobiologia* 147: 83-89.
58. SNELL T.W. (1998) : Chemical ecology of rotifers - *Hydrobiologia* 387/388: 267-276.

59. STARKWEATHER, P.L. (1995) : Near-coronal fluid flow patterns and food cell manipulation in the rotifer *Brachionus calyciflorus* - *Hydrobiologia* 313-314: 191-195.
60. STEMBERGER, R.S. & J.J. GILBERT (1985) : Body size, food concentration, and population growth in planktonic rotifers – *Ecology* 66: 1151-1159.
61. VIROUX, L.(2000) : Dynamique du métazooplancton en milieu fluvial, Thèse de Doctorat, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Presses Universitaires de Namur, 309p + annexes.
62. WALZ, N. (1983) Individual culture and experimental population dynamics of *Keratella cochlearis* – *Hydrobiologia* 107: 35-45.
63. WILLIAMSON, C.E. (1983) : Invertebrate predation on planktonic rotifer - *Hydrobiologia* 104:385-396.
64. YÚFERA, M. (1987) : Effect of algal diet and temperature on the embryonic development time of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture -*Hydrobiologia* 147: 319-322.